

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ENDO-MICROSCOPIE DU CERVEAU COMBINANT MICROSCOPIE CONFOCALE EN  
FLUORESCENCE ET TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE DOPPLER

ÉMILIE BEAULIEU OUELLET

DÉPARTEMENT DE GÉNIE PHYSIQUE

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES  
(GÉNIE PHYSIQUE)

DÉCEMBRE 2014

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé:

ENDO-MICROSCOPIE DU CERVEAU COMBINANT MICROSCOPIE CONFOCALE EN  
FLUORESCENCE ET TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE DOPPLER

présenté par : BEAULIEU OUELLET Émilie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. GERVAIS Thomas, Ph. D., président

Mme BOUDOUX Caroline, Ph. D., membre et directrice de recherche

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. LEBLOND Frédéric, Ph. D., membre et codirecteur de recherche

M. COHEN-ADAD Julien, Ph. D., membre

## DÉDICACE

*À mon conjoint, ma famille, mes amis et collègues,  
pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de mes études*

## REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier Frédéric Lesage de m'avoir donné la chance de réaliser ce projet de maîtrise. Je ne saurais jamais remercier assez Caroline Boudoux, qui m'a donné envie de faire de la recherche et de me spécialiser en physique tout au long de mes études. Je remercie aussi Frédéric Leblond pour les conversations que nous avons eues. Merci à tous mes collègues, avec qui les échanges et clubs de lecture m'ont permis d'apprendre énormément (merci spécialement à Mathias Strupler, Fouzi Benboujja, Wendy-Julie Madore, Étienne De Montigny, Amber Beckley, Kathy Beaudette, Nadir Goulamhoussen, Romain Deterre, Samuel Bélanger, Edgar Guevara, Maryam Tabatei et Romain Berti). Je tiens à remercier Kathy pour tous ses commentaires qui m'ont aidée à réaliser ce mémoire. J'espère pouvoir connaître un milieu de travail aussi stimulant et avoir d'aussi bons collègues tout au long de ma carrière!

Je remercie sincèrement mon conjoint, Antoine, pour son soutien sans égal et son aide technique tout au long de mon projet de maîtrise. Merci aussi à mes amis, tout particulièrement Julie et Emmanuelle, d'avoir été à mon écoute et de m'aider à relever les défis d'un projet de recherche. Finalement, je tiens à remercier spécialement ma famille, qui m'a donné tant de support pendant toutes ces longues années d'études et sans qui je n'en serais pas là!



## RÉSUMÉ

L'épilepsie affecte près de 50 millions de personnes à travers le monde, parmi lesquelles 30% ne répondent pas aux traitements. Lorsqu'un patient ne répond pas au traitement, la résection de la zone irritée devient nécessaire dans les cas difficiles. Le défi pour l'épileptologue devient donc l'identification de cette zone. Les techniques classiques utilisées pour la localiser sont : le test clinique neurologique, les électroencéphalogrammes (EEG), l'implantation d'électrodes intracrâniennes et l'imagerie par résonance magnétique (IRM) anatomique pour identifier les lésions. Parallèlement, les chercheurs explorent les techniques fonctionnelles, et utilisent de plus en plus des techniques d'imagerie hémodynamique. Pour mieux comprendre ces signaux, il est essentiel de connaître le lien entre l'hyperactivité des neurones et les signaux hémodynamiques qui en résultent. Malheureusement, ce lien reste indéterminé en raison de la complexité des changements d'oxygénation du sang et des tissus lors d'évènements épileptiques. Afin d'élucider ce lien, les techniques actuelles ne permettent pas d'imager simultanément l'activité neuronale avec une résolution cellulaire et le flux sanguin dans le cortex du cerveau murin.

La microscopie confocale en fluorescence (MCF), combinée à des marqueurs du calcium, est un outil potentiel pour imager directement l'activité neuronale avec une résolution sous cellulaire. Le suivi du flux sanguin dans des vaisseaux individuels et avec une profondeur de pénétration acceptable peut quant à lui être réalisé avec la tomographie par cohérence optique Doppler (DOCT). Cette technique basée sur l'interférométrie permet d'imager à une profondeur de 2 à 3 mm avec une résolution d'une dizaine de microns. Lorsqu'ils sont combinés à un endo-microscope, chacun de ces systèmes pourrait permettre d'imager en profondeur dans le cerveau. Cependant, la MCF et le DOCT n'ont pas encore été combinés à travers un endo-microscope adapté à ces deux modalités.

L'objectif de ce projet est de développer un système d'imagerie microscopique pouvant mesurer l'activité neuronale et hémodynamique, puis d'évaluer la performance de ce système. Nous proposons donc de concevoir un endo-microscope multimodal combinant la MCF et le DOCT dans un bras d'imagerie commun pour les deux modalités. Ce bras peut être facilement manipulé ou installé sur un stage stéréotaxique puisqu'il est relié par fibre optique au reste du système. Le bras comporte un système 2D de galvanomètres pour l'imagerie 2D en MCF et l'imagerie 3D en DOCT. Il est terminé par un endoscope composé d'un système de lentilles à gradient d'indice de

réfraction (GRIN) permettant de maximiser la résolution et de minimiser les aberrations.

La validation des deux systèmes a été réalisée à l'aide de cibles de résolution, de fantômes puis *in vivo* sur des souris. L'endo-microscope a été inséré dans le cortex du cerveau de souris à travers une fenêtre de craniotomie. Nous avons imagé le cortex avec la MCF à 473 nm et réalisé un suivi de l'activité hémodynamique à l'aide d'un système de DOCT à 870 nm.

Ce travail montre qu'il est possible de combiner de la microscopie confocale en fluorescence avec du DOCT à travers un endoscope. Ce projet montre également qu'un tel système pourrait devenir un outil utile pour l'étude de l'épilepsie, ainsi que pour définir le lien entre l'hyperactivité des neurones et les signaux hémodynamiques qui en résultent. Il a par ailleurs permis d'identifier des défis tels que la combinaison modalités à des longueurs d'onde différentes et l'insertion de microendoscopes de manière minimalement invasive.

## ABSTRACT

Epilepsy affects about 50 million people worldwide; 30% of which are unresponsive to treatment. Resection of the affected brain area needs to be performed for patients with severe epilepsy who remain unresponsive to treatment. The identification of the affected area is challenging. Techniques routinely used to localize this area include neurological examination, electroencephalography (EEG), stereoencephalography (SEEG), and magnetic resonance imaging (MRI). Researchers use functional imaging in to study epilepsy. With the increasing use of hemodynamic imaging techniques to characterize the epileptic brain, a clear link between the hyperactivity of neurons and ensuing hemodynamic signals is required to better understand these signals. Unfortunately, hemodynamic signals are confounded due to complex behavior of oxygenation in blood and tissue. Current techniques cannot image simultaneously neuronal activity at cell resolution and blood flow in the cortex in order to propose their relation to epilepsy.

Confocal fluorescence microscopy (CFM) has proven to be a great tool to image directly neuronal activity with micron level resolution, using calcium indicators. The monitoring of blood flow in single vessels with a high penetration depth has been successfully achieved with Doppler optical coherence tomography (DOCT). This technique based on interferometry allows to image at a depth of 2-3 mm with a resolution of about 10  $\mu\text{m}$ . When combined to an endo microscope, each of these systems can image deeply into the brain. However, CFM and DOCT have not been combined yet through an endo-microscope adapted to both modalities.

The goal of this work is to develop a microscopic imaging system that can measure both neuronal activity and hemodynamics and then investigate its performance. We propose to design a multimodal endo-microscope combining confocal fluorescence microscopy (CFM) and Doppler optical coherence tomography (DOCT). A common imaging arm for both modalities includes a 2D galvanometer system for 2D imaging in CFM and 3D imaging in DOCT, and is terminated by a GRIN triplet. The triplet was designed to relay light deeply into the brain and maximize resolution. The common imaging arm can be manipulated or installed on a stereotaxic holder during the imaging session, as light collection is performed through optical fibers.

Validation of both systems was done by imaging resolution targets, phantoms and *in vivo* or *post*

*mortem* on mice. We imaged the cortex with CFM at 473 nm using a  $\text{Ca}^{2+}$  and monitored hemodynamics with DOCT at 870 nm. The mice brain cortex was imaged through a craniotomy window.

This work shows that CFM and DOCT can be combined through a microendoscope. We also showed that this system has a lot of potential to help define the link between the hyperactivity of neurons and ensuing hemodynamic signals. This link would surely lead to a better understanding of brain diseases such as epilepsy. We have also highlighted challenges encountered when working at different wavelengths and inserting microendoscopes into tissues.

## TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS .....	IV
RÉSUMÉ.....	V
ABSTRACT .....	VII
TABLE DES MATIÈRES .....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XII
LISTE DES FIGURES.....	XIII
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....	XVII
LISTE DES ANNEXES .....	XIX
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
1.1 Le cerveau et l'épilepsie.....	4
1.1.1 Couplage neurovasculaire .....	4
1.1.2 L'épilepsie.....	5
1.2 L'imagerie du cerveau épileptique.....	7
1.2.1 Imagerie clinique.....	7
1.2.2 Imagerie en recherche .....	7
1.3 Survol de l'imagerie optique biomédicale .....	12
1.4 Bases de la microscopie confocale en fluorescence.....	13
1.5 Bases de l'OCT .....	17
1.5.1 Interféromètre de Michelson .....	17
1.5.2 L'OCT dans le domaine temporel.....	20
1.5.3 L'OCT dans le domaine de Fourier.....	21

1.5.4	L'OCT Doppler .....	22
1.6	L'endoscopie pour l'imagerie optique .....	24
1.6.1	Faisceaux de fibres optiques .....	25
1.6.2	Lentilles à gradient d'indice (GRIN) .....	25
1.7	Combinaison de l'OCT et de la microscopie confocale.....	28
1.8	Résumé de la problématique .....	30
1.9	Hypothèses de recherche .....	30
1.10	Question et objectifs de recherche .....	31
1.10.1	Objectifs spécifiques: .....	31
1.11	Structure du mémoire .....	32
CHAPITRE 2	CONCEPTION .....	33
2.1	Design du microscope confocal en fluorescence .....	33
2.2	Design du système d'OCT Doppler .....	37
2.3	Design de l'endoscope GRIN.....	38
2.4	Combinaison du microscope confocal et de l'OCT dans l'endoscope.....	41
2.5	Montage expérimental.....	47
CHAPITRE 3	RÉSULTATS ET DISCUSSION .....	50
3.1	Microscope confocal en fluorescence .....	50
3.1.1	Caractérisation <i>ex vivo</i> .....	50
3.1.2	Résultats <i>in vivo</i> .....	52
3.2	DOCT .....	53
3.2.1	Résultats <i>ex vivo</i> en DOCT .....	53
3.2.2	Résultats <i>in vivo</i> en DOCT .....	55
3.3	Système multimodal avec l'endo-microscope.....	55

3.3.1 Résultats en microscopie confocale avec l'endoscope.....	55
3.3.2 Résultats en OCT avec l'endoscope.....	57
CHAPITRE 4 DISCUSSION.....	59
4.1 Microscopie confocale en réflectance et en fluorescence .....	59
4.2 OCT Doppler.....	60
4.3 Différence entre le microscope avec et sans GRIN.....	61
4.4 Amélioration de l'endoscope .....	61
4.5 Amélioration de la flexibilité du bras d'imagerie .....	63
4.6 Imagerie confocale multiplexée en longueur d'onde .....	63
CHAPITRE 5 CONCLUSION.....	64
5.1 Synthèse des travaux .....	64
5.2 Travaux futurs .....	64
BIBLIOGRAPHIE .....	66
ANNEXES .....	75

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Différentes longueurs de GRIN et leurs applications (CVI Melles Griot, n.d.).....	28
Tableau 3.1 Rayon du sténopé en fonction des fibres d'émission et de détection sélectionnées ...	36
Tableau 3.2 Impact de différents paramètres de conception d'un endoscope GRIN sur la qualité de l'image obtenue .....	40
Tableau 3.3 Spécifications de l'endoscope pour le design de triplet .....	40
Tableau 3.4 Paramètres caractéristiques des pièces optiques utilisées pour le bras d'imagerie .....	46
Tableau 4.1 Précision de la mesure de flux dans un capillaire (Baraghis et al., 2011) .....	54



## LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Différents acteurs impliqués dans le couplage neurovasculaire.....	5
Figure 1.2 : Canal calcique tensiodépendant.....	6
Figure 1.3 : Rôle du calcium dans l'activation neuronale.....	9
Figure 1.4 Imagerie du cerveau épileptique, avec une crise générée par l'injection de bicuculline. A) niveau de fluorescence dans le temps pour 4 zones distinctes B) images en fluorescence à différents moments C) EEG dans le temps D) portions de l'EEG agrandies. (tiré de Vincent et al., 2006).....	10
Figure 1.5 OCT Doppler angiographique (tiré de Bolduc et al., 2011) .....	11
Figure 1.6 Intensité normalisée du signal OCT d'une région d'intérêt du cortex dans le temps. On remarque que l'intensité est stable avant l'injection de PTZ. L'intensité diminue d'environ 10% avant le début de la crise épileptique, permettant ainsi de prédire le début d'une crise. (tiré de Eberle et al., 2012).....	12
Figure 1.7 Comparaison de différentes techniques d'imagerie non invasive selon leur profondeur de pénétration et leur résolution spatiale (Bouma, 2001).....	13
Figure 1.8 Schéma d'un microscope confocal montrant l'effet des sténopés d'illumination et de détection sur le sectionnement optique. ....	14
Figure 1.9 Distribution de l'intensité au plan focal pour un microscope conventionnel (à gauche) et un microscope confocal (à droite). On remarque que les PSF radiale (selon $r$ ) et axiale (selon $z$ ) sont plus confinées en microscopie confocale. (tiré de Boudoux, 2007).....	16
Figure 1.10 Schéma d'un microscope confocal. Le faisceau se propage de la source vers les galvanomètres, le télescope télécentrique (composé des lentilles $f_1$ et $f_2$ ), l'objectif puis l'échantillon. La lumière rétrodiffusée par l'échantillon retourne alors à travers le télescope puis est réfléchi par une lame séparatrice vers un sténopé et un détecteur. ....	17
Figure 1.11 Interféromètre de Michelson. Le signal d'interférence, ici la sinusoïde rouge, s'obtient lorsque le miroir M1 est déplacé à une vitesse constante. ....	18

Figure 1.12 Interférogramme (bleu) issu d'un interféromètre de Michelson pour un laser de longueur de cohérence finie. La largeur à mi-hauteur de l'enveloppe (noir) définit une quantité appelée temps de cohérence (tiré de "Coherence (physics)," 2014) .....	19
Figure 1.13 Schéma du fonctionnement d'OCT dans le domaine temporel (TD-OCT) (image reproduite avec permission du LODI).....	20
Figure 1.14 Distance de Rayleigh d'un faisceau ("Gaussian beam," 2014).....	21
Figure 1.15 Schéma du fonctionnement d'OCT dans le domaine spectral (SD-OCT) (image reproduite avec permission du LODI).....	22
Figure 1.16 Schéma du fonctionnement d'OCT Doppler (TD-OCT) (image reproduite avec permission du LODI) .....	23
Figure 1.17 Flux sanguin dans un capillaire. A) Représentation schématique d'un capillaire. B) Coupe du capillaire (surface elliptique) dans le plan perpendiculaire à la lumière (tiré de Baraghis, 2011) .....	24
Figure 1.18 a) micro lentille conventionnelle qui focalise la lumière grâce à son rayon de courbure. b) lentille à gradient d'indice qui focalise la lumière grâce à la variation de son indice de réfraction ("Gradient-index optics," 2014).....	26
Figure 1.19 Propagation de la lumière dans une GRIN (tiré de CVI Melles Griot, n.d.) .....	27
Figure 2.1 Schéma du montage de microscopie confocale en fluorescence. FC3-6: collimateurs de fibres, G: galvanomètres, L1-2: lentilles du télescope, D2: miroir dichroïque, Fi: filtres, PMT: photomultiplicateur, Obj: objectif de microscope. ....	33
Figure 2.2 Imagerie confocale en fluorescence avec une fibre pour l'illumination et une fibre pour la détection. $d$ : diamètre du cœur de la fibre de détection, MFD : diamètre de champ de mode ( <i>mode field diameter</i> ), $f_{coll}$ : distance focale de la lentille de collimation, $f_{obj}$ : distance focale de l'objectif, $a_{obj}$ : rayon de la pupille. ....	35
Figure 2.3 a) Sectionnement optique ( $u_{1/2}$ ) pour un plan parfaitement réfléchissant en fonction du ratio $d/\text{MFD}$ pour différentes valeurs de remplissage de pupille ( $A$ ). b) Efficacité d'excitation $\eta$ pour un plan parfaitement réfléchissant au focus ( $u=0$ ) en fonction du ratio	

$d/MFD$ pour différentes valeurs de $A$ . (tiré de Lemire-Renaud, Strupler, Benboujja, Godbout, & Boudoux, 2011; Boudoux, PhD Thesis, 2007) .....	36
Figure 2.4 Schéma du montage d'OCT Doppler. PC: contrôleur de polarisation, P: prismes, VND: filtre à densité neutre variable, M: miroir, G: galvanomètres, L1-2: lentilles, D1: miroir dichroïque, Obj: objectif de microscope, SLED: diode superluminescente. (Baraghis et al., 2011).....	37
Figure 2.5 Designs retenus pour l'endoscope. A) triplet GRIN B) doublet GRIN.....	39
Figure 2.6 Montage de l'endo-microscope combinant l'OCT et la microscopie confocale .....	42
Figure 2.7 Effet du diamètre du faisceau sur l'ouverture numérique effective d'un objectif et la distance de Rayleigh.....	43
Figure 2.8 Trajet optique à travers le micro-endoscope pour des faisceaux à l'entrée de différentes tailles. Faisceau plein: remplit la pupille de l'objectif GRIN. Faisceau pointillé: ne remplit pas complètement la pupille de l'objectif GRIN. ....	44
Figure 2.9 Bras d'imagerie du système commun.....	47
Figure 2.10 Positionnement de l'endoscope. a) support à extrémité du bras d'imagerie b) vue schématique de côté et de face du support de l'endoscope (unités : mm). L'endoscope est tenu en place à l'aide d'une vis de pression munie d'un bout en nylon.....	48
Figure 2.11 Montage expérimental. a) rappel du montage schématique. b) objectif de microscope suivi de la monture de translation X-Y puis de la GRIN et de la souris tenue en place à l'aide d'un stage séréotaxique et de barres d'oreilles. La souris est positionnée sur une plaque chauffante. c) plan rapproché de l'insertion de la GRIN dans le cerveau à travers une fenêtre de craniotomie. ....	49
Figure 3.1 : Groupe 7, élément 6 d'une cible de résolution négative USAF 1951 imagée en réflectance avec le microscope confocal (sans la partie endoscopique assurée par le relai GRIN).....	50
Figure 3.2 : a) résolution latérale b) résolution axiale pour le montage avec fibre de détection de cœur de 50 $\mu$ m (régression polynomiale) .....	51

Figure 3.3 : microbilles de 1µm imagées en fluorescence avec le microscope confocal sans l'endoscope GRIN. Les flèches pointent sur quelques microbilles individuelles. ....	52
Figure 3.4: Vaisseaux sanguins du cerveau de souris post mortem, dans lesquels du FITC a été injecté, imagés à travers une fenêtre de craniotomie avec le microscope confocal (sans la GRIN). Les flèches pointent vers la jonction entre plusieurs vaisseaux. ....	53
Figure 3.5 Validation du DOCT par l'imposition d'un flux dans un tube rempli d'intralipide A. Coupe transversale du tube (projection selon l'axe X), le fantôme de 200 µm de diamètre est incliné vers le bas et couvre une épaisseur de 500 µm. B. Vue de haut, c'est à travers la région sélectionnée que le flux est calculé. La couleur indique la vitesse. (tiré de Baraghis et al., 2011). ....	54
Figure 3.6 Calcul du débit pulsatile dans une artère individuelle sur une souris de contrôle Figure tirée de (tiré de Baraghis et al., 2011) .....	55
Figure 3.7 : Cible de résolution négative USAF 1951 imagée en réflectance avec l'endomicroscope GRIN en mode confocal. ....	56
Figure 3.8 : microbilles de 1µm imagées en fluorescence avec l'endo-microscope GRIN en mode confocal. Les flèches rouges pointent vers des microbilles individuelles. ....	56
Figure 3.9 Vaisseaux sanguins du cerveau de souris post mortem, auquel du FITC a été injecté, imagés à travers une fenêtre de craniotomie avec l'endo-microscope GRIN en mode confocal .....	57
Figure 3.10 : tube de 150 µm de diamètre rempli d'intralipide imagé avec le système Doppler OCT. Ici, un flux de 1µl/min est imposé .....	58
Figure 4.1 : Spectre d'excitation et d'émission du fluorophore Oregon Bapta-1 Green .....	60
Figure 4.2 endoscope GRIN terminé par un micro prisme dont l'hypoténuse comporte un revêtement réfléchissant. a) propagation du faisceau à travers l'endoscope et le micro prisme. b) en déplaçant et en pivotant l'endoscope, un champ de vue plus large peut être reconstruit à partir de sa trajectoire hélicoïdale. ....	62
Figure 4.3 : remplacement du filtre dichroïque séparant le signal de fluorescence du signal d'OCT par un coupleur .....	63

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des sigles et abréviations présente, dans l'ordre alphabétique, les sigles et abréviations utilisés dans le mémoire ou la thèse ainsi que leur signification.

D	Miroir dichroïque
EEG	Électroencéphalographie
FC	Coupleur de fibres
FOV	Champ de vue
G	Miroir galvanométriques
GRIN	Lentille à gradient d'indice de réfraction
L	lentille
IRM	Imagerie par résonance magnétique
M	Miroir
NA	Ouverture numérique
MCF	Microscopie confocale en fluorescence
MFD	<i>Mode field diameter</i>
NIRS	Spectroscopie dans le proche infrarouge
Obj	Objectif de microscope
OCT	Tomographie par cohérence optique
OD	Densité optique

OIS	Imagerie optique des signaux intrinsèques
P	Prisme
PC	Contrôleur de polarisation
PH	Pinhole (sténopé)
PMT	Tube photomultiplicateur
PSF	Fonction d'étalement du point
SLED	Diode superluminescente
SS-OCT	Tomographie par cohérence optique basé sur un laser à balayage
TEP	Tomographie par émission de positons
TD-OCT	Tomographie par cohérence optique dans le domaine temporel
VND	filtre à densité neutre variable

## **LISTE DES ANNEXES**

ANNEXE 1 – LISTE DES PIÈCES .....	74
ANNEXE 2 – SPÉCIFICATIONS DE L’ENDOSCOPE GRIN .....	81

## INTRODUCTION

Différentes techniques d'imagerie sont couramment utilisées en clinique chez les patients épileptiques, telles que l'EEG-vidéo, le test neurologique, l'implantation d'électrodes, l'IRM, le SPECT, le TEP et la MEG. Dans un contexte clinique, ces techniques servent principalement à détecter les crises et permettent de visualiser le cerveau en entier de manière non invasive.

Les mécanismes de l'épilepsie sont directement reliés à l'activité neuronale (Tadmouri et al., 2012). Or, les techniques d'imagerie utilisées cliniquement ont une résolution spatiale insuffisante pour visualiser des neurones individuels. De plus, elles ne donnent pour la plupart qu'une mesure indirecte de l'activité neuronale (hémodynamique ou métabolique). Quant à l'EEG, il s'agit d'une mesure directe, mais elle ne mesure que des groupes de neurones synchrones et orientés tels que le champ électrique créé donne un signal mesurable sur l'électrode.

Pour mieux comprendre les mécanismes de l'épilepsie, il serait utile de pouvoir imager directement un neurone et son activité et de lier cette activité aux changements métaboliques et hémodynamiques. L'imagerie optique dite « balistique » est une technique qui permet justement d'imager à haute résolution l'activité neuronale à l'aide de marqueurs fluorescents. Sa faible profondeur de pénétration empêche toutefois de l'utiliser de manière non invasive. L'imagerie optique n'est donc généralement pas utilisée en clinique pour l'imagerie du cerveau, mais des endo-microscopes minimalement invasifs sont de plus en plus utilisés en recherche (Barretto et al., 2011; Ghosh et al., 2011; Kim et al., 2012; König et al., 2008; Levene, Dombeck et al., 2004).

L'objectif de ce projet est de concevoir un outil qui permettra d'éclaircir le lien entre l'activité neuronale et l'activité hémodynamique, dans le but de pouvoir relier les observations réalisées cliniquement chez les patients et les mécanismes cellulaires qui sont associés à l'épilepsie. L'imagerie optique balistique est une technique idéale pour imager à haute résolution l'activité neuronale (microscopie confocale en fluorescence) et l'activité hémodynamique (DOCT).

La microscopie confocale est analogue à la microscopie conventionnelle, mais emploie une illumination point par point et rejette la lumière hors focus par l'utilisation d'un sténopé positionné devant le détecteur. La présence de ce sténopé a pour effet d'améliorer la résolution et d'augmenter le contraste des images, en diminuant néanmoins l'intensité détectée. L'imagerie de



fluorophores avec ce type de microscope est un outil puissant qui permet d'imager spécifiquement certaines molécules ou protéines d'intérêt. Dans le cas du cerveau, des marqueurs fluorescents du calcium permettent d'imager directement l'activité neuronale.

La tomographie par cohérence optique (OCT) est basée sur le principe d'interférométrie, qui permet de rejeter les photons diffusés en exploitant la cohérence du signal détecté. Cette technique est analogue à l'imagerie ultrasonore, mais permet d'obtenir une plus haute résolution grâce à l'utilisation de lumière. L'utilisation de lumière à une longueur d'onde typiquement plus élevée qu'en microscopie confocale permet de pénétrer plus profondément dans les tissus (1-3 mm), mais à une résolution axiale un peu plus faible (de l'ordre de la dizaine de micron). En mode Doppler, l'OCT permet de détecter le mouvement de diffuseurs tels que les globules rouges. Le fonctionnement d'un système OCT sera décrit plus en détail au chapitre suivant.

Pour étudier l'épileptogénèse, notamment à travers le lien entre différentes régions du cerveau qui s'excitent les unes les autres, il est nécessaire de pouvoir imager des zones profondes, notamment les noyaux thalamiques qui jouent un rôle essentiel dans la propagation de la crise. Puisque la profondeur de pénétration des techniques d'imagerie optique ne permet pas d'atteindre cette région du cerveau, nous développons ici un endo-microscope minimalement invasif pour transmettre et recueillir la lumière à cette profondeur. Les endo-microscopes les plus couramment utilisés pour l'imagerie optique sont composés de fibres ou de lentilles à gradient d'indice (Flusberg et al., 2005; Niederer et al., 2001). Les endo-microscopes fibrés possèdent l'avantage d'être flexibles, mais leur résolution est limitée par le nombre de fibres qui les composent. Ces dernières sont rigides, mais cela convient parfaitement à l'imagerie du cerveau, pour laquelle l'utilisation de neuro aiguilles est courante (Liang et al., 2011; Pillai, Lorensen, & Sampson, 2011).

Dans ce mémoire, nous proposons de réaliser d'abord une revue de littérature afin d'expliquer les modalités d'imagerie utilisées ainsi que l'avancement des connaissances sur l'épilepsie. Ensuite, nous rappellerons la problématique et résumerons les objectifs de recherche. Les différents paramètres de conception seront alors présentés en détails. Les éléments de design de chaque microscope et de l'endoscope seront décrits, puis le système expérimental pour l'imagerie du cerveau murin sera détaillé. Au chapitre 3, les différents éléments du système seront validés, puis les résultats obtenus par l'imagerie *ex vivo* et *in vivo* seront présentés. Les difficultés rencontrées

lors du design, de la conception et de l'expérimentation seront discutées au chapitre 4. Des solutions et suggestions seront également proposées dans ce chapitre. Un retour sur les réalisations de ce projet et ses applications conclura ce mémoire.

## CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE

Dans le but de couvrir les bases ayant permis de réaliser ce projet et de mettre en perspective son lien avec l'étude de l'épilepsie, nous présentons ici une revue de littérature. Nous décrirons d'abord l'épilepsie, pour ensuite situer l'imagerie optique par rapport aux autres techniques. Nous présenterons alors l'imagerie optique, puis les fondements propres à la microscopie confocale en fluorescence et à l'OCT. Les différentes méthodes proposées pour réaliser des endoscopes optiques seront également abordées.

### 1.1 Le cerveau et l'épilepsie

Dans cette section, nous présenterons les différents aspects reliés au cerveau nécessaires à la compréhension de ce projet. Nous commencerons par le couplage neurovasculaire, qui est à l'origine du choix des modalités d'imagerie, pour ensuite discuter de l'épilepsie et des méthodes d'imagerie qui ont été utilisées jusqu'à présent pour l'imager.

#### 1.1.1 Couplage neurovasculaire

L'activité neuronale et l'activité hémodynamique sont interconnectées. Les différents mécanismes qui les relient sont nommés couplage neurovasculaire (Girouard & Iadecola, 2006).

Intuitivement, on comprend que de l'énergie est nécessaire pour qu'une activité neuronale ait lieu. En effet, le déclenchement d'un influx nerveux est précédé d'un changement dans les concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane du neurone, et résulte en la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Le gradient ionique est rétabli graduellement après l'influx. Pour y parvenir, l'activation des canaux ioniques et le transport des vésicules contenant les neurotransmetteurs requièrent de l'énergie. Cette dernière est assurée par la respiration cellulaire (générations d'ATP), qui se fait à l'aide de l'apport d'oxygène provenant des vaisseaux sanguins (Leithner & Royle, 2013). Ainsi, tel que le résume la Figure 1.1, l'activité neuronale dépend de l'activité hémodynamique pour avoir lieu.

Les mécanismes permettant de solliciter l'énergie requise pour l'activité neuronale reposeraient sur des agents vasoactifs. Ces derniers seraient produits par les neurones et les cellules gliales puis dirigés vers des cellules endothéliales, des péricytes et des muscles lisses du cerveau (Attwell et al., 2010). Ces agents agiront à différents niveaux sur la vascularisation, ce qui aura

pour effet de moduler l'apport sanguin au cerveau. Cette modulation étant particulièrement complexe et impliquant différents acteurs, il est difficile de relier directement les changements d'activité hémodynamique à l'activité neuronale.

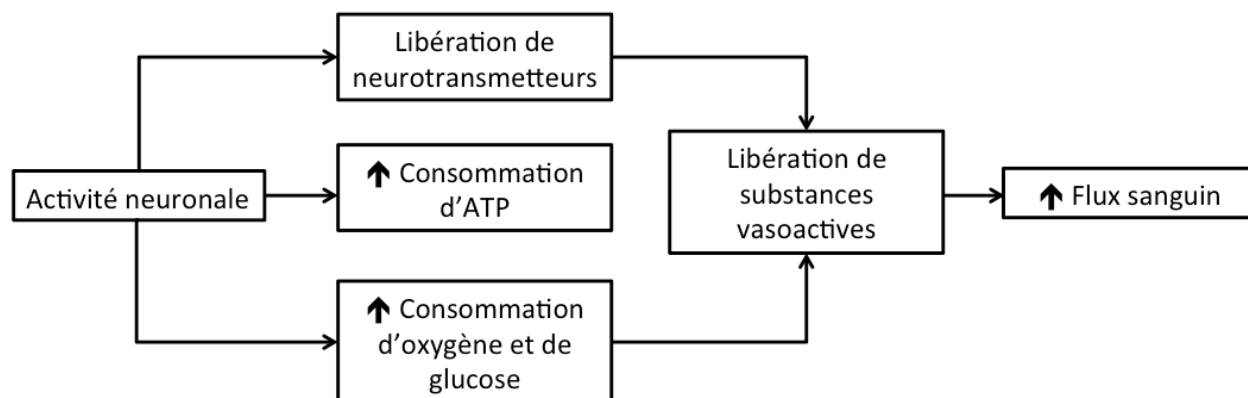


Figure 1.1 : Différents acteurs impliqués dans le couplage neurovasculaire.

### 1.1.2 L'épilepsie

L'épilepsie est un groupe de troubles neurologiques caractérisés par des crises épileptiques. Ces crises peuvent être brèves et presque impossibles à détecter, ou bien longues et accompagnées de tremblements intenses. Les crises sont généralement récurrentes et résultent d'une excitation excessive, d'une synchronisation anormale ou d'une inhibition inadéquate des neurones corticaux ou sous corticaux (Shorvon, 2009).

Dans certains cas, l'épilepsie peut être causée par des blessures, des accidents cérébrovasculaires, une tumeur cérébrale, ou un abus de substances. Dans la plupart des cas, l'épilepsie serait d'origine génétique (Prasher & Kerr, 2008). Parmi les gènes impliqués, plusieurs affectent des canaux ioniques, des enzymes et les neurotransmetteurs GABA (acide  $\gamma$ -aminobutyrique) (Tadmouri et al., 2012).

#### Mécanismes de l'épilepsie

Les mécanismes sous tendant l'épilepsie sont reliés à l'excitabilité de neurones. En effet, l'activité d'un neurone est normalement suivie par une désensibilisation de ce neurone, qui l'empêche d'être excité de nouveau pendant un certain laps de temps (Prasher & Kerr, 2008). Dans le cas d'un sujet épileptique, ce mécanisme de désensibilisation est défaillant. Cela résulte

en une activité neuronale synchrone excessive et une vague de dépolarisation caractéristiques de l'épilepsie.

Des études ont démontré que certains types d'épilepsie génétique sont liés à un dysfonctionnement de l'unité beta de canaux calciques tensiodépendants (Baulac et al., 2001; Greer & Greenberg, 2008). En effet, le courant de calcium qui passe par ces canaux contrôle l'expression génétique causant des mutations associées à l'épilepsie.

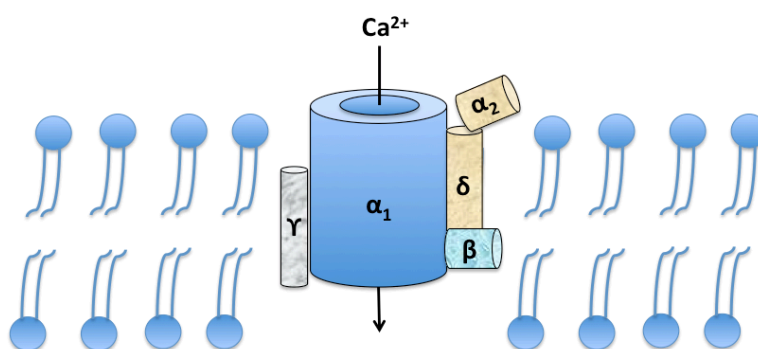


Figure 1.2 : Canal calcique tensiodépendant

### Modèles épileptiques

Il est possible d'induire un type d'épilepsie génétique en créant par exemple des changements aux canaux calciques (Rossignol, 2011). En effet, il est possible d'empêcher l'expression de gènes codant pour certaines sous unités des canaux calciques. Les modèles animaux obtenus par induction génétique de l'épilepsie présentent des crises épileptiques spontanées et récurrentes (Löscher, 2011).

La méthode la plus couramment utilisée pour provoquer des modèles de crises épileptiques demeure toutefois l'injection systémique d'agents convulsants. Cette méthode présente l'avantage d'être simple et directe. Parmi les agents utilisés, on retrouve la bicuculline, un antagoniste compétitif des récepteurs GABA<sub>A</sub> (Pitkänen, Schwartzkroin, & Moshé, 2005) ainsi que l'antagoniste non-compétitif pentylenetetrazol (PTZ). On retrouve aussi la 4-aminopyridine (4-AP), qui bloque les canaux du potassium (Peña & Tapia, 2000).

Une autre méthode pouvant être utilisée pour induire des crises épileptiques est l'utilisation de stimulus électrique. Cette méthode est utilisée principalement pour tester plusieurs substances potentiellement anti convulsantes dans un court laps de temps (Löscher, 2011).

## **1.2 L'imagerie du cerveau épileptique**

Cette section présentera l'état de l'art concernant l'imagerie du cerveau épileptique. Nous allons d'abord présenter les techniques conventionnelles utilisées en clinique pour imager le cerveau de patients épileptiques. Ensuite, nous traiterons des techniques utilisées en recherche pour imager avec une meilleure résolution spatiale l'activité neuronale puis hémodynamique.

### **1.2.1 Imagerie clinique**

Le standard pour l'étude du cerveau épileptique est l'EEG intracrânienne vidéo à long terme. Cette technique consiste à enregistrer simultanément une image vidéo du patient et de son EEG pour pouvoir ensuite faire le lien entre les tremblements associés à la crise et l'EEG. Cliniquement, l'EEG présente l'avantage d'avoir une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde. Il est donc facilement possible de visualiser un changement dans les pics d'un EEG lorsqu'une crise épileptique a lieu (Valentín & Alarcón, 2012). Cette méthode est toutefois invasive, et n'est donc pas réalisée fréquemment chez les patients.

L'étude du cerveau chez les patients épileptiques se fait régulièrement par une combinaison d'imagerie par résonance magnétique (IRM) avec de la tomographie par émission de positrons (TEP) ou de la tomographie d'émission monophotonique (SPECT). Le TEP, le SPECT et le fIRM permettent de réaliser de l'imagerie fonctionnelle. Ces méthodes reposent sur la quantification du flux sanguin cérébral pour refléter l'activité neuronale, et permettent ainsi de détecter le focus de l'épilepsie (la Fougère, Rominger, Förster, Geisler, & Bartenstein, 2009). Ces techniques présentent l'avantage d'imager le cerveau des patients en entier. Le fIRM est non invasif, alors que le TEP et le SPECT nécessitent l'injection d'un radiotraceur. La résolution spatiale de ces techniques est toutefois de l'ordre du centimètre.

### **1.2.2 Imagerie en recherche**

Pour la recherche fonctionnelle de l'épilepsie et en vue de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de cette pathologie, il est important de pouvoir visualiser l'activité de neurones

individuels. L'IRM et l'EEG ne possèdent ni la résolution spatiale, ni la spécificité pour détecter cela. Il est aussi primordial de pouvoir visualiser avec précision l'activité hémodynamique. En recherche fondamentale, il est possible de reproduire des crises épileptiques chez des modèles animaux tels que des souris. Il est possible d'utiliser des techniques moins éprouvées cliniquement, minimalement invasives ou avec un plus petit champ de vue sur ces modèles. Nous présenterons donc des techniques d'imagerie utilisées en recherche fondamentale pour étudier l'activité neuronale et hémodynamique du cerveau.

### **Imagerie de l'activité neuronale**

Le courant de certains ions tels que le calcium est directement relié à l'activité neuronale. En effet, les canaux calciques dépendants en tension présentent une perméabilité sélective aux ions du calcium qui joue un rôle central dans la génération de potentiels d'action. Lorsqu'un neurone est à son potentiel de repos, ces canaux sont fermés. Lorsque le potentiel augmente, les canaux calciques s'ouvrent pour permettre à des ions de sodium d'entrer dans le neurone. Cela change le gradient électrochimique du neurone et génère une augmentation du potentiel membranaire qui incite à son tour l'ouverture d'autres canaux du sodium. Le potentiel d'action atteint ainsi son maximum. Lorsque ce potentiel d'action est transmis à la terminaison axonale, l'ouverture de canaux calciques stimule la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique, tel qu'illustré à la Figure 1.3. Ce sont ces neurotransmetteurs qui permettront finalement la stimulation du neurone post synaptique.

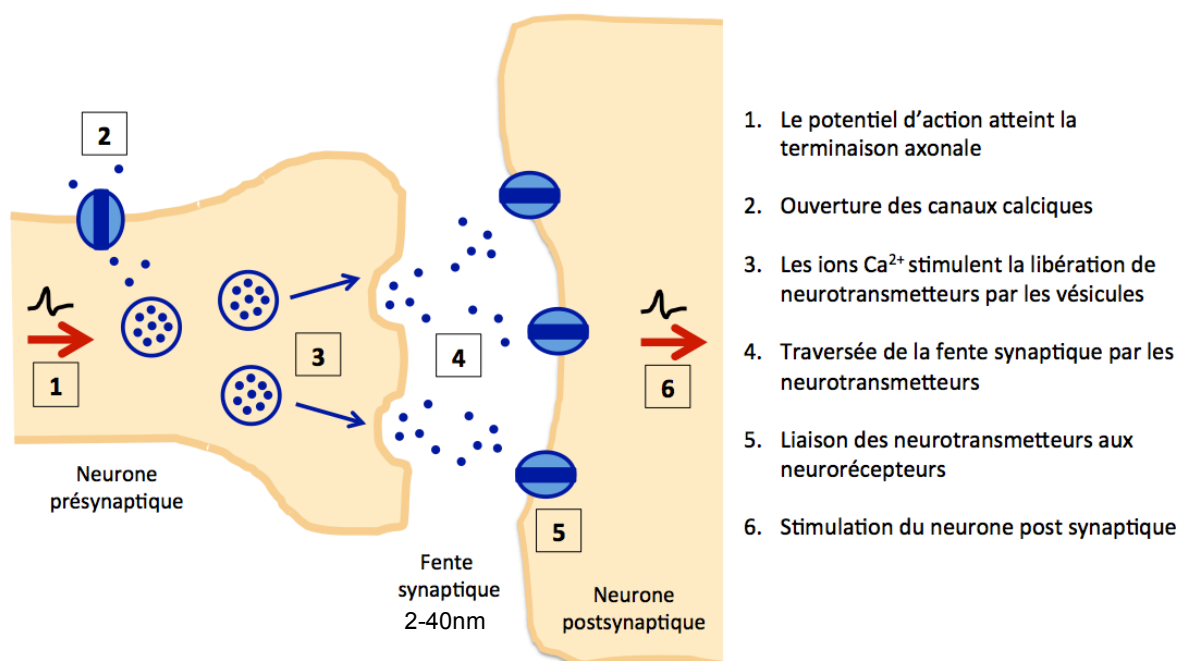


Figure 1.3 : Rôle du calcium dans l'activation neuronale

Visualiser la quantité d'ion  $\text{Ca}^{2+}$  libre dans l'espace intracellulaire est donc un moyen direct de suivre l'activité neuronale. Pour y parvenir, il est possible d'utiliser des marqueurs qui fluorescent lorsqu'ils se lient au  $\text{Ca}^{2+}$ . Lors de la liaison avec le  $\text{Ca}^{2+}$ , le spectre de fluorescence du marqueur subit un décalage spectral. L'amplitude de ce décalage permet de quantifier ou d'évaluer qualitativement la concentration des ions dans l'espace extracellulaire. Des groupes ont ainsi utilisé l'imagerie optique en fluorescence sur des animaux pour étudier l'épilepsie (Tadmouri et al., 2012; Vincent et al., 2006).

Tel que présenté à Figure 1.4, il est possible de relier l'imagerie en fluorescence à l'EEG, qui est une technique fréquemment utilisée en clinique pour étudier l'épilepsie. Il serait aussi possible de faire des cartes d'activation neuronale pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à une pathologie. La microscopie confocale en fluorescence présente l'avantage d'avoir une résolution axiale et latérale de l'ordre du micron, et ainsi de pouvoir détecter des neurones individuels (la taille d'un neurone varie entre  $4\mu\text{m}$  et  $100\mu\text{m}$ ). Cette technique sera décrite davantage dans les sections suivantes.



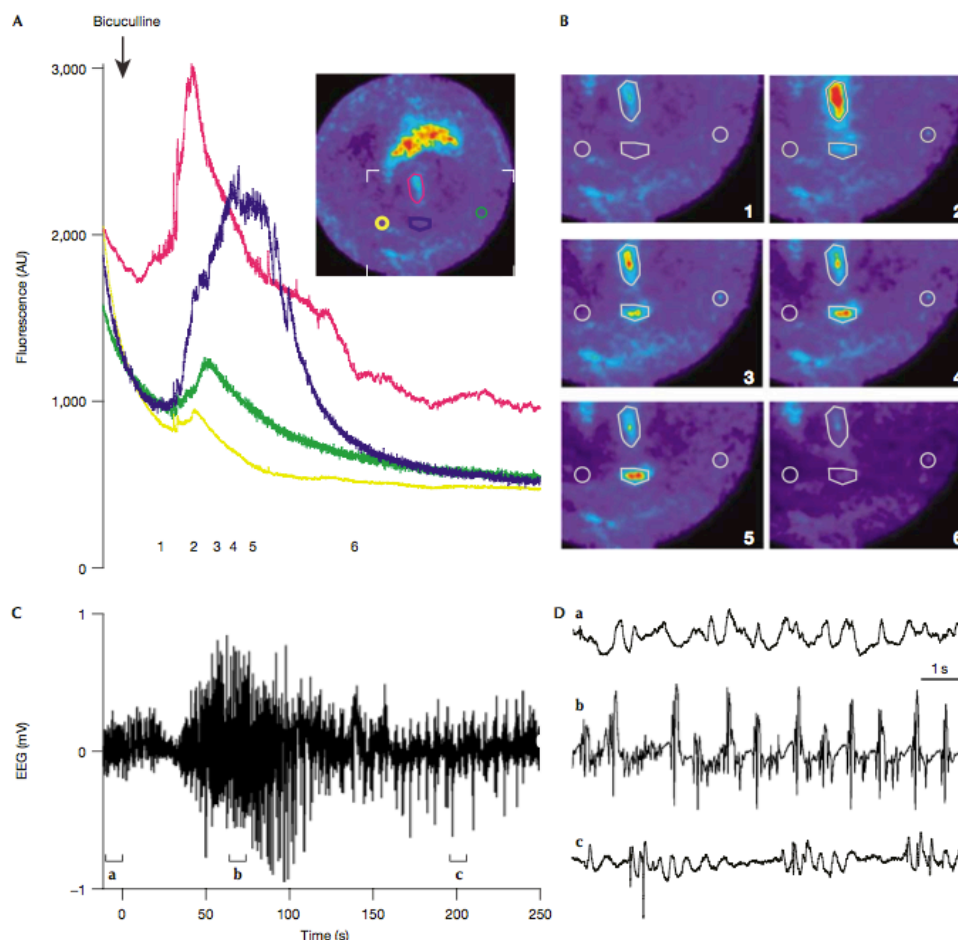


Figure 1.4 Imagerie du cerveau épileptique, avec une crise générée par l'injection de bicuculline. A) niveau de fluorescence dans le temps pour 4 zones distinctes B) images en fluorescence à différents moments C) EEG dans le temps D) portions de l'EEG agrandies. (tiré de Vincent et al., 2006)

### Imagerie de l'activité hémodynamique

L'imagerie fonctionnelle du cerveau de petits animaux requiert de mesurer les flux rapides dans les plus grosses artères, ainsi que des flux aussi lents que 1 mm/s dans les petits capillaires. De plus, afin d'imager en profondeur le cerveau murin, il doit être possible d'acquérir des images à une profondeur de l'ordre du centimètre. Il est aussi préférable d'avoir une bonne profondeur d'imagerie de manière à pouvoir visualiser plusieurs vaisseaux simultanément.

Différentes méthodes permettent d'étudier l'activité hémodynamique du cerveau. C'est le cas notamment de l'IRM fonctionnelle, de la TEP, de la spectroscopie dans le proche infrarouge (NIS), de l'imagerie des signaux intrinsèques, de la microscopie à deux photons de l'OCT Doppler (DOCT) et de l'imagerie par ultrasons focalisés (Macé et al., 2011). Parmi ces

techniques, la plupart n'ont pas une résolution suffisante pour visualiser des vaisseaux individuels. D'autres techniques, comme l'imagerie des signaux intrinsèques, n'ont pas une profondeur de pénétration suffisante (Srinivasan et al., 2009). Quant à la microscopie à deux photons, elle requiert l'injection de fluorophores et possède une profondeur d'imagerie limitée par rapport à l'OCT (Fujimoto, 2009).

Le DOCT est une technique à hautes résolution et profondeur de pénétration qui peut être utilisée pour étudier des profils de vitesse et imager la microvasculature cérébrale. Cette technique a notamment permis de révéler le réseau de perfusion sanguine du cortex chez le rat avec une résolution de l'ordre du capillaire (Baraghis et al., 2011). D'autres études ont permis de mesurer des changements de flux sanguin induits par des stimulations et de suivre la circulation du flux sanguin et sa résistance lors d'ischémies. Il est également possible d'étudier la compliance vasculaire et son effet sur l'athérosclérose (Farooq, Khasnis, Majid, & Kassab, 2009). Sur le petit animal, il est possible d'utiliser le DOCT directement à travers le crâne (qui peut être aminci pour augmenter la profondeur de pénétration). L'utilisation d'endoscopes peut également permettre d'imager directement dans le tissu. Des sondes DOCT ont d'ailleurs été utilisées pour guider la neurochirurgie et éviter d'endommager des vaisseaux sanguins. Les bases du DOCT seront décrites plus en détails dans la prochaine section.

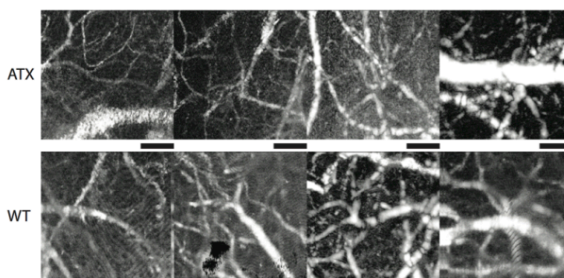


Figure 1.5 OCT Doppler angiographie (tiré de Bolduc et al., 2011)

Il est intéressant de noter qu'il est également possible d'utiliser l'OCT en mode structurel pour détecter des crises épileptiques. En effet, Eberle et al. (2012) a démontré que les propriétés des tissus changent lors d'une crise d'épilepsie. En effet, une réduction de l'espace extracellulaire précéderait les crises et engendrerait une diminution du signal lumineux rétrodiffusé. Cette réduction serait causée par l'activation d'astrocytes et l'œdème résultant du flux d'ions et d'eau lors de l'activité neuronale excessive (Hajihashemi, Zhang, Ormerod, & Jiang, 2014). Il est ainsi

possible d'utiliser l'intensité moyenne d'images OCT pour prévoir des crises épileptiques chez le petit animal.

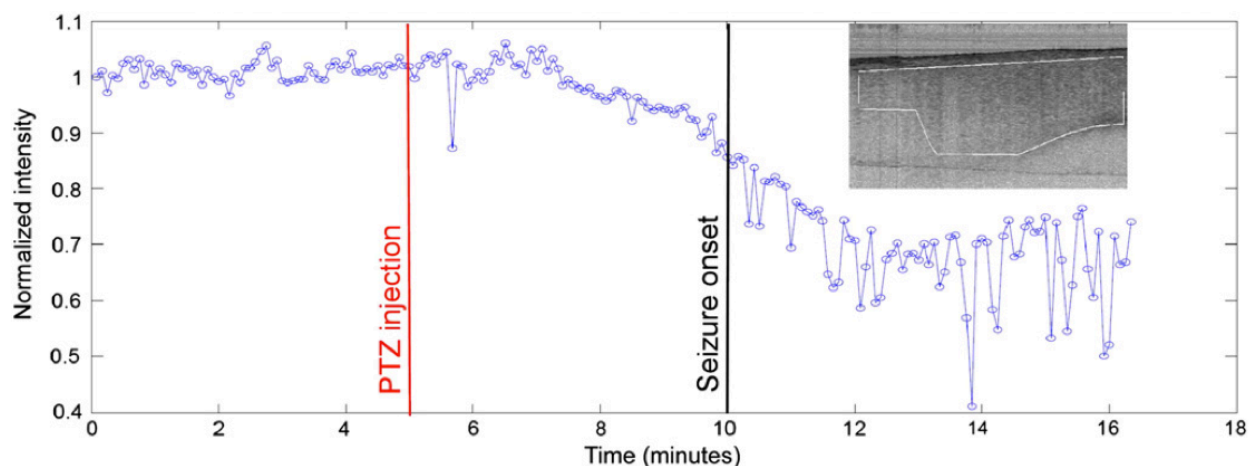


Figure 1.6 Intensité normalisée du signal OCT d'une région d'intérêt du cortex dans le temps. On remarque que l'intensité est stable avant l'injection de PTZ. L'intensité diminue d'environ 10% avant le début de la crise épileptique, permettant ainsi de prédire le début d'une crise. (tiré de Eberle et al., 2012)

### 1.3 Survol de l'imagerie optique biomédicale

Contrairement à d'autres techniques, l'imagerie optique présente l'avantage d'être non invasive ou minimalement invasive, non ionisante et de permettre l'imagerie de spécimens vivants (non fixés). L'imagerie optique comporte deux catégories : l'imagerie diffuse et celle dite balistique. Les techniques d'imagerie diffuse, telle que la spectroscopie dans le proche infrarouge (NIRS), reposent sur la mesure de photons rétro-diffusés. Ces techniques permettent d'imager à une profondeur de quelques centimètres, avec une résolution spatiale également de l'ordre du centimètre (Fujimoto, 2009). Les techniques d'imagerie balistique, quant à elles, ne tiennent pas compte des photons absorbés et ne considèrent que les photons ayant subi peu ou pas de diffusion, ce qui permet d'obtenir une résolution à la limite de la diffraction (Wang & Wu, 2012). La microscopie confocale, la microscopie à deux photons et l'OCT sont quelques exemples de techniques balistiques ou quasi balistiques. La principale limitation de ces techniques pour l'imagerie *in vivo* est leur faible profondeur de pénétration. Pour pallier ce problème, de plus en plus de sondes ou endoscopes sont proposés comme relais minimalement invasifs (Niederer et al., 2001). Une autre limite des techniques balistiques est le faible rapport signal-sur-bruit. Une

attention particulière doit être apportée au design optique de ces systèmes pour maximiser la collection du faible signal balistique.

En résumé, si on la compare avec d'autres techniques d'imagerie médicale comme l'IRM, le TEP ou l'échographie, l'imagerie optique balistique présente généralement une meilleure résolution, un très bon contraste, mais avec une plus faible profondeur de pénétration et un plus petit champ de vue. On peut visualiser cette comparaison à la Figure 1.7.

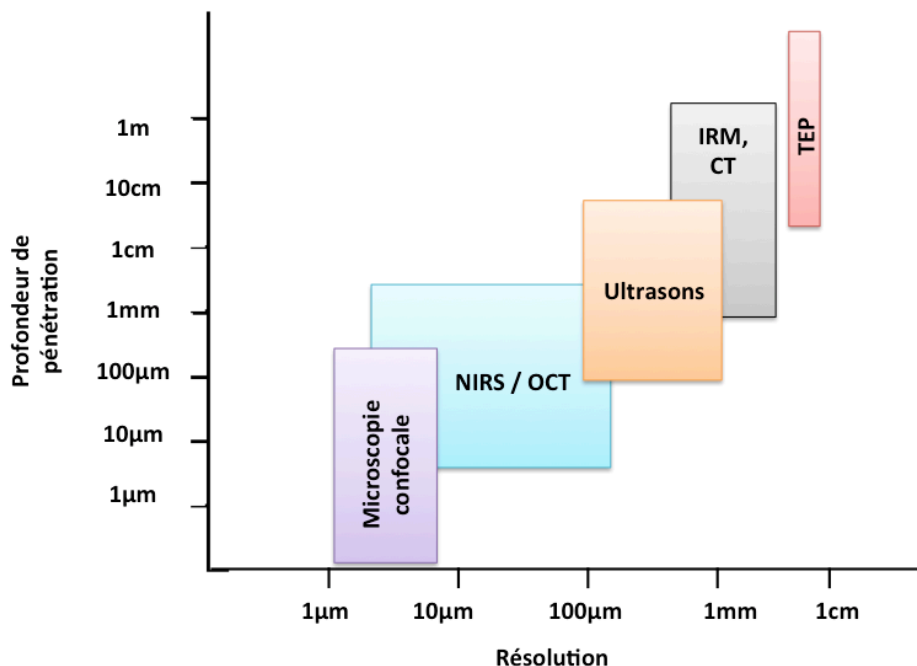


Figure 1.7 Comparaison de différentes techniques d'imagerie non invasive selon leur profondeur de pénétration et leur résolution spatiale (Bouma, 2001)

## 1.4 Bases de la microscopie confocale en fluorescence

La microscopie confocale utilise la lumière réfléchie ou la fluorescence pour produire des images avec une résolution latérale qui peut être inférieure au micromètre et un sectionnement optique également de l'ordre du micromètre. Les sections optiques consécutives ainsi générées offrent la possibilité de reconstruire en 3D des spécimens fixés ou vivants. De plus, l'ajout de marqueurs fluorescents ou l'utilisation de fluorophores endogènes facilite l'identification de molécules ou de structures spécifiques.

La microscopie confocale présente des avantages intéressants par rapport à la microscopie optique à champ large conventionnelle. En effet, cette technique permet de diminuer le flou hors-foyer en éliminant l'information émise par les plans adjacents au plan focal. Tel qu'illustré à la Figure 1.8, la profondeur de champ est contrôlée par la largeur du sténopé, qui rejette les photons rétro-diffusés qui ne proviennent pas du plan focal, ainsi que par l'ouverture numérique (NA) de l'objectif de microscope ( $NA = n \sin \theta$ , où  $n$  est l'indice de réfraction du milieu et  $\theta$  est la moitié de l'angle maximal du cône d'acceptance de l'objectif). Plus le sténopé est petit, meilleur sera le confinement optique. Toutefois, un compromis doit être fait entre la résolution et la quantité de signal récupéré.

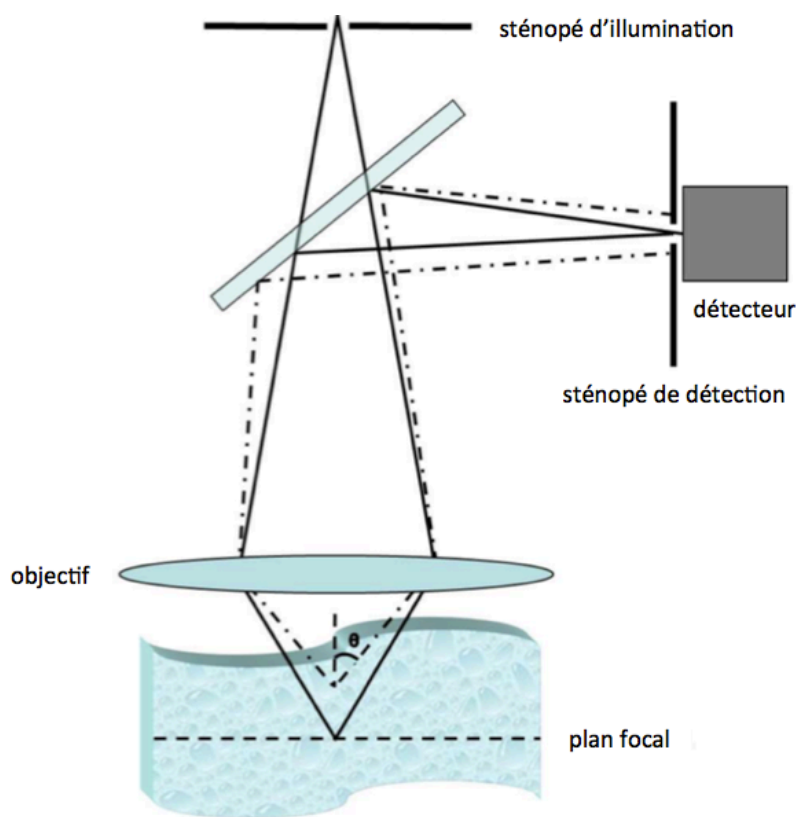


Figure 1.8 Schéma d'un microscope confocal montrant l'effet des sténopés d'illumination et de détection sur le sectionnement optique.

On peut visualiser à la Figure 1.9 l'impact de l'utilisation d'un sténopé sur la résolution radiale et le sectionnement optique à l'aide de la fonction d'étalement du point (ou *point spread function*, PSF) du système. La PSF d'une lentille (Wang & Wu, 2012) est donnée par :

$$h(u, v) = 2 P(\rho) \int_0^1 \exp\left(\frac{i u \rho^2}{2}\right) J_0(\rho v) \rho d\rho \quad (1.1)$$

où  $P$  est le champ à la pupille de l'objectif, qui dépend de la coordonnée radiale  $\rho$ ,  $u$  et  $v$  représentent des coordonnées normalisées latérale et axiale, respectivement. La fonction de Bessel est représentée par  $J_0$  (type 1, ordre 0). La PSF en champ en microscopie conventionnelle est donnée par le carré de la PSF en intensité. En microscopie confocale, le volume excité est très confiné et la PSF en intensité correspond plutôt à la PSF d'illumination multipliée par la PSF de détection. On obtient donc les PSF en champ suivantes selon le type de microscopie utilisée (Boudoux, 2007):

$$\text{Microscopie conventionnelle : } PSF(u, v) = |h(u, v)|^2 \quad (1.2)$$

$$\text{Microscopie confocale : } PSF(u, v) = |h(u, v)|^4 \quad (1.3)$$

Les résolutions radiale et axiale peuvent être obtenues en évaluant la PSF en microscopie confocale en  $u=0$  et  $v=0$  respectivement :

$$PSF_{rad}(v) = \left| 2 \frac{J_1(v)}{v} \right|^4 \quad (1.4)$$

$$PSF_{ax}(u) = \text{sinc}^4\left(\frac{u}{4\pi}\right). \quad (1.5)$$

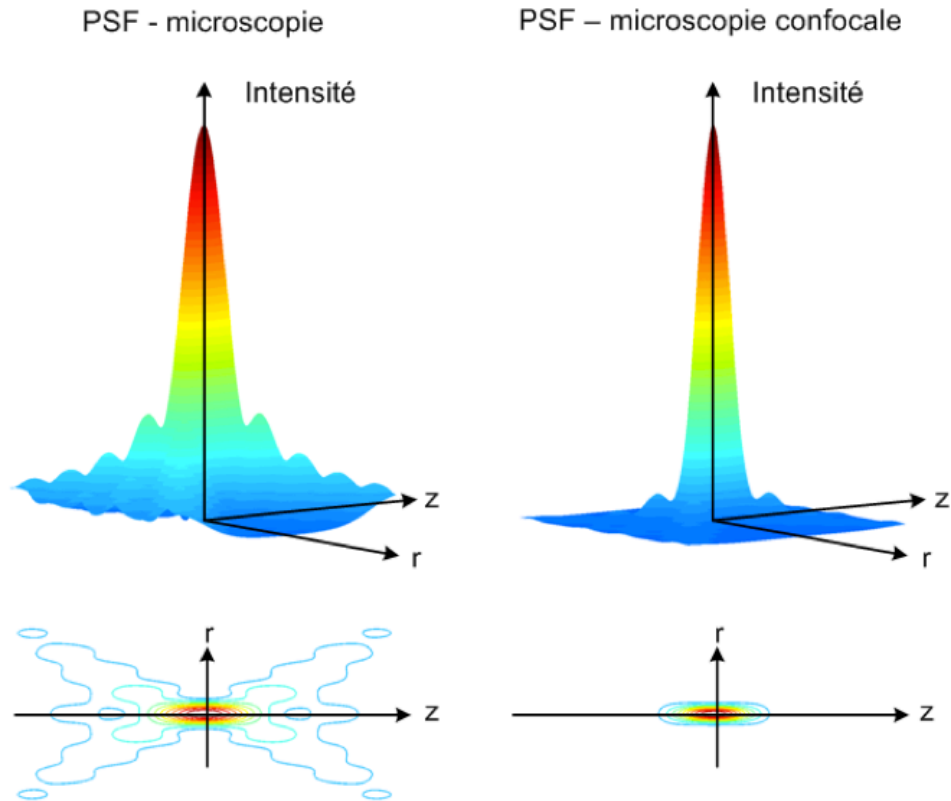


Figure 1.9 Distribution de l'intensité au plan focal pour un microscope conventionnel (à gauche) et un microscope confocal (à droite). On remarque que les PSF radiale (selon  $r$ ) et axiale (selon  $z$ ) sont plus confinées en microscopie confocale. (tiré de Boudoux, 2007)

Concrètement, le confinement de la PSF en microscopie confocale a pour effet d'améliorer la résolution latérale, qui est déterminée par la limite de diffraction définie par le critère de Rayleigh:

$$\text{Microscopie conventionnelle : } \Delta r = \frac{0.6\lambda}{NA} \quad (1.6)$$

$$\text{Microscopie confocale : } \Delta r = \frac{0.4\lambda}{NA} \quad (1.7)$$

Le montage d'un microscope confocal est présenté à la Figure 1.10. Le balayage de l'échantillon est réalisé à l'aide de miroirs galvanométriques, et le signal de fluorescence est dirigé vers un détecteur à l'aide d'une lame séparatrice.

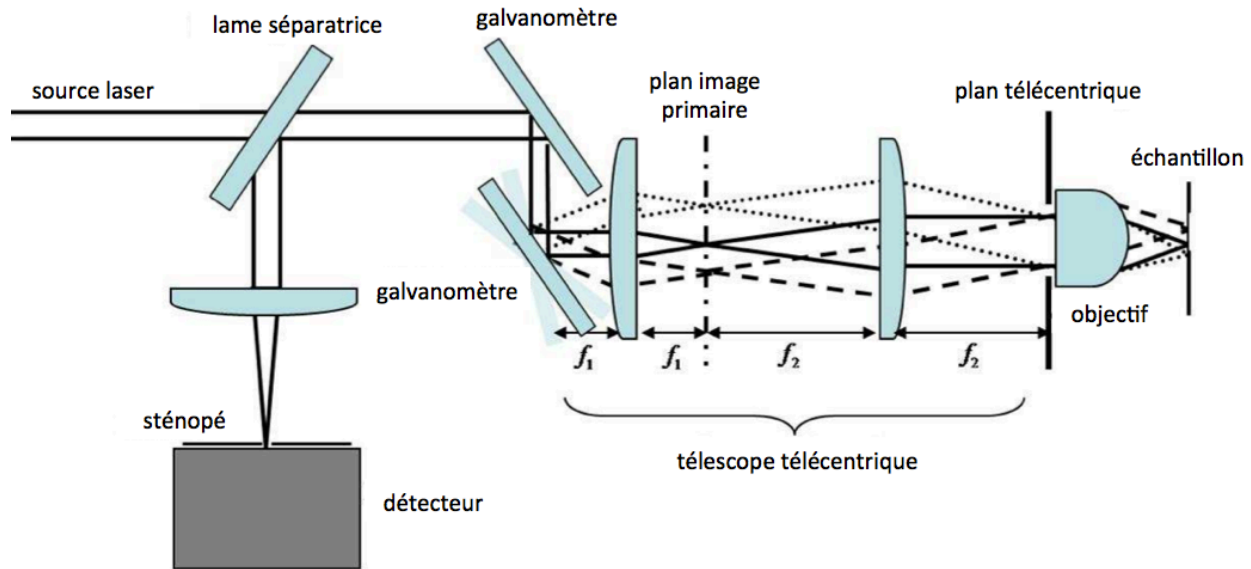


Figure 1.10 Schéma d'un microscope confocal. Le faisceau se propage de la source vers les galvanomètres, le télescope télécentrique (composé des lentilles  $f_1$  et  $f_2$ ), l'objectif puis l'échantillon. La lumière rétrodiffusée par l'échantillon retourne alors à travers le télescope puis est réfléchi par une lame séparatrice vers un sténopé et un détecteur.

## 1.5 Bases de l'OCT

L'OCT permet d'imager des matériaux semi-transparents tels que les tissus biologiques avec une grande sensibilité et repose sur l'interférométrie à faible cohérence. Afin d'illustrer le concept d'interférométrie, nous abordons cette section par une révision de l'interféromètre de Michelson que nous étudierons dans un premier temps dans un mode monochromatique avant d'introduire le concept de faible cohérence exploité par l'OCT.

### 1.5.1 Interféromètre de Michelson

L'interféromètre de Michelson est typiquement composé d'une lame séparatrice séparant le faisceau d'une source lumineuse en deux chemins optiques. Ces deux faisceaux sont réfléchis par des miroirs, puis recombinaison pour générer un patron d'interférence. La figure 5 illustre ce concept.



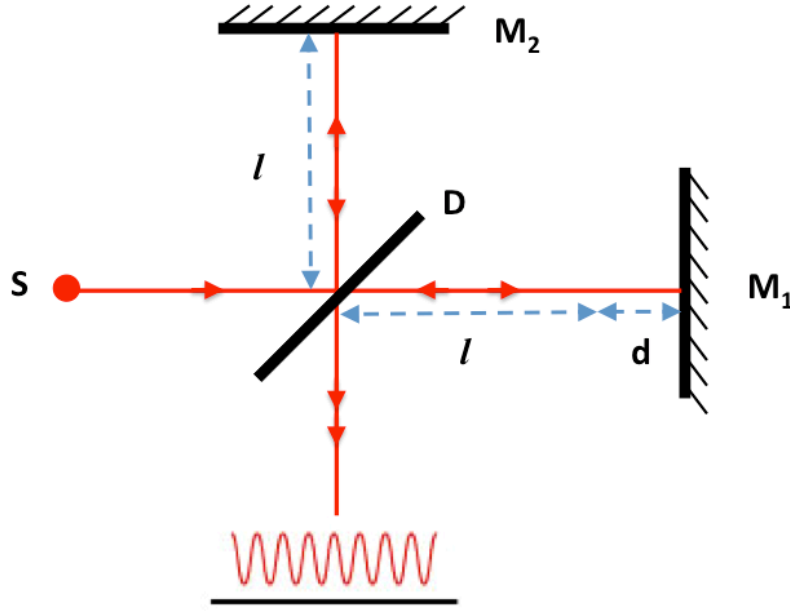


Figure 1.11 Interféromètre de Michelson. Le signal d'interférence, ici la sinusoïde rouge, s'obtient lorsque le miroir M1 est déplacé à une vitesse constante.

On peut mieux comprendre le signal obtenu en étudiant le champ électrique des différents faisceaux. Pour une source monochromatique de fréquence angulaire centrale  $\omega_0$ , le champ électrique,  $E$ , dans chacun des bras peut être exprimé ainsi avant de se recombiner:

$$E_1 = E_{01} \exp(i(2kl_1 - \omega_0 t)) \quad (1.8)$$

où  $E_{01}$  et  $E_{02}$  sont les normes des champs,  $k$  est le vecteur d'onde (identique pour les deux milieux), puis  $l_1$  et  $l_2$  sont les distances parcourues dans chaque bras.

Le courant obtenu au détecteur après l'interférence des deux faisceaux est proportionnel à l'intensité  $I$  du signal optique résultant de la somme des amplitudes complexes des faisceaux :

$$I \propto |E_1 + E_2|^2 \propto [E_{01}^2 + E_{02}^2 + 2E_{01}E_{02} \cos(k \cdot 2d)] \quad (1.9)$$

où les distances de parcours ont été simplifiées par  $l_2 = l_1 + d$ . Pour une source monochromatique parfaite, l'intensité détectée en fonction de la distance de marche  $d$  entre les deux bras de l'interféromètre est, donc, une sinusoïde dont la période est donnée par  $\lambda/2$ . Par contre, pour une source polychromatique, ou à faible cohérence, il n'y aura d'interférence que pour de très faibles valeurs de différence de chemin optique  $d$ . Cet intervalle, nommé la longueur de cohérence,

correspond à la largeur de l'enveloppe de l'interférogramme et définit la résolution axiale du système OCT. Le temps de cohérence  $\tau_c$  associé à cette longueur correspond à la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la fonction d'autocorrélation de la source, tel qu'illustré à la Figure 1.12.

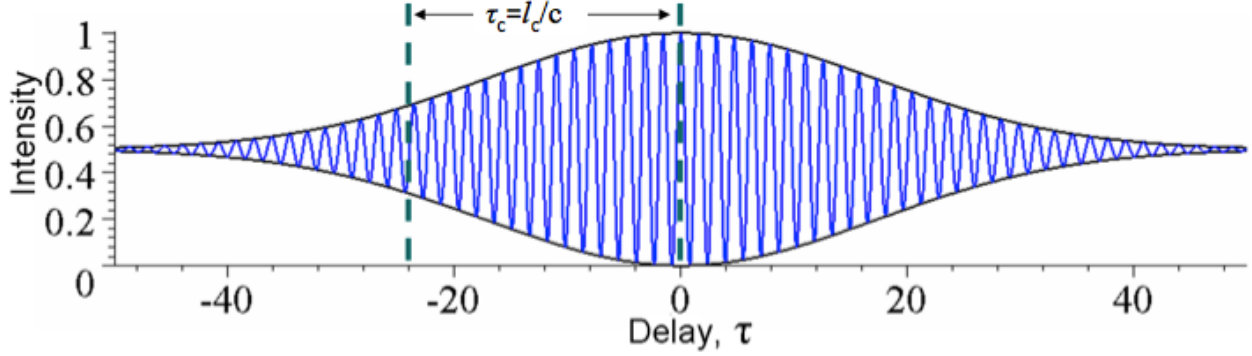


Figure 1.12 Interférogramme (bleu) issu d'un interféromètre de Michelson pour un laser de longueur de cohérence finie. La largeur à mi-hauteur de l'enveloppe (noir) définit une quantité appelée temps de cohérence ("Coherence (physics)," 2014)

On peut déduire la longueur de cohérence à l'aide du théorème de Wiener-Kinchin, qui relie la densité spectrale  $S(\omega)$  de la source gaussienne à la fonction d'autocorrélation  $G(\tau)$ , tel que :

$$\int_{-\infty}^{+\infty} G(\tau) e^{i\omega\tau} d\tau = |E(\omega)|^2 = S(\omega). \quad (1.10)$$

Connaissant la densité spectrale de puissance de la source gaussienne suivante, où  $\omega_0$  est la fréquence angulaire centrale et  $\sigma_\omega$  est l'écart type de  $\omega$ :

$$S(\omega) = \frac{1}{\sigma_\omega \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(\omega - \omega_0)^2}{2\sigma_\omega^2}}. \quad (1.11)$$

On peut retrouver  $G(\tau)$  en faisant la transformée inverse de la densité spectrale de puissance. On obtient ainsi la largeur à mi-hauteur de cette gaussienne:

$$\Delta z_r = 2\sqrt{2 \ln(2)} \sigma_\omega. \quad (1.12)$$

En effectuant les remplacements nécessaires pour passer dans le domaine des longueurs d'onde, on obtient la résolution axiale suivante, qui correspond à la moitié de la longueur de cohérence :

$$\Delta z_r = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} = \frac{l_c}{2}. \quad (1.13)$$

### 1.5.2 L'OCT dans le domaine temporel

Un système OCT comporte deux bras : un bras d'échantillon et un bras de référence (constitué d'un miroir). La lumière est réfléchiée par le spécimen à imager dans le bras d'échantillon. Cette lumière génère un patron d'interférence lorsque la distance optique parcourue dans le bras d'échantillon est très proche de celle parcourue dans le bras de référence.

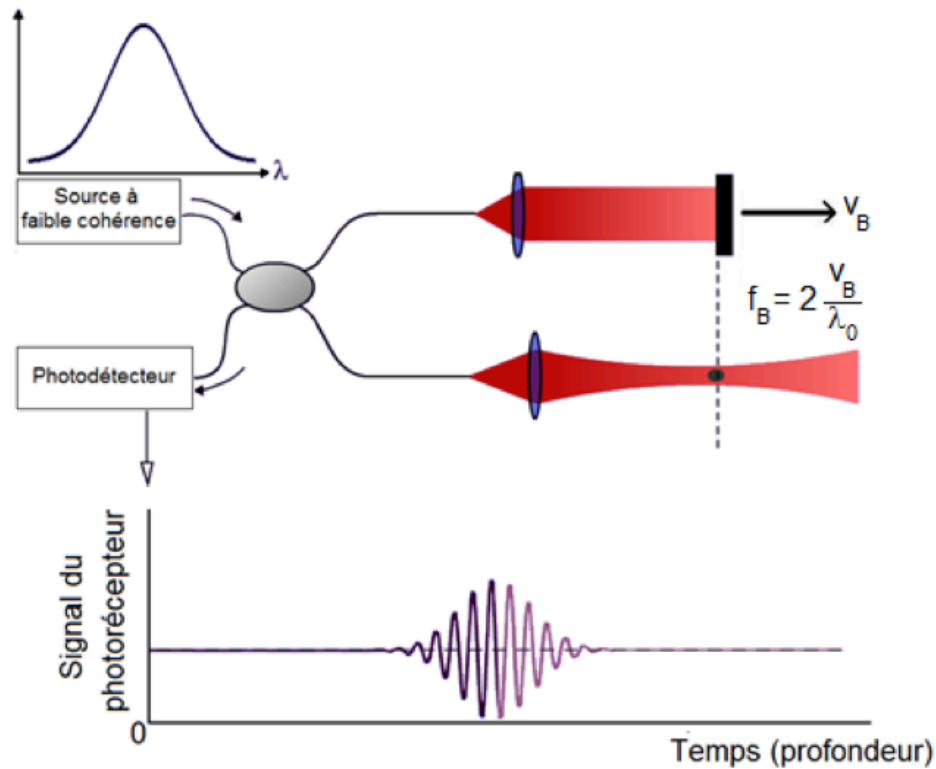


Figure 1.13 Schéma du fonctionnement d'OCT dans le domaine temporel (TD-OCT) (image reproduite avec permission du LODI)

Le profil de réflectivité de l'échantillon peut être créé en faisant varier la position du miroir dans le bras de référence. Les régions plus réfléchissantes de l'échantillon génèrent un signal d'intensité plus élevée. Toute lumière réfléchiée par l'échantillon à une distance plus grande que

longueur de cohérence ne pourra interférer avec le bras de référence (Fujimoto, Pitris, Boppart, & Brezinski, 2000).

On peut déterminer la profondeur des structures de l'échantillon à partir du moment auquel le signal est reçu au détecteur ainsi que la vitesse de balayage du miroir :

$$z = v_B t \quad (.14)$$

La profondeur maximale pour laquelle le signal réfléchi par l'échantillon contribuera à générer de l'interférence est déterminée par la distance de Rayleigh  $b$  du faisceau, reliée à l'étrangement  $w_0$  et illustrée à la Figure 1.14:

$$w_0 = \frac{2\lambda}{\pi\theta} \quad (1.15)$$

$$b = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda}. \quad (1.16)$$

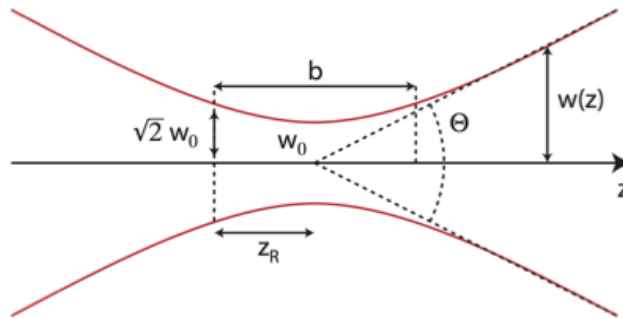


Figure 1.14 Distance de Rayleigh d'un faisceau ("Gaussian beam," 2014)

Le principal inconvénient de l'OCT dans le domaine temporel est que sa vitesse d'imagerie est limitée par la vitesse de déplacement mécanique du miroir. Pour survenir à cet obstacle, il est possible d'utiliser l'OCT dans le domaine de Fourier.

### 1.5.3 L'OCT dans le domaine de Fourier

Il est possible de s'affranchir du déplacement mécanique du miroir du bras de référence du système d'OCT dans le domaine temporel en effectuant un balayage spectral, illustré à la Figure 1.15. Il suffit pour cela d'utiliser une source à large bande, telles que des SLED ou des lasers femtosecondes, et de remplacer le détecteur du TD-OCT par un spectromètre. Il est aussi possible

de faire varier directement la longueur d'onde de la source. Ces deux techniques, dites du domaine de Fourier, permettent un balayage plus rapide que l'OCT du domaine temporel. Pour obtenir le profil de réflectivité de l'échantillon en fonction de la profondeur, il suffit de réaliser la transformée de Fourier du signal reçu par le spectromètre dans le temps.

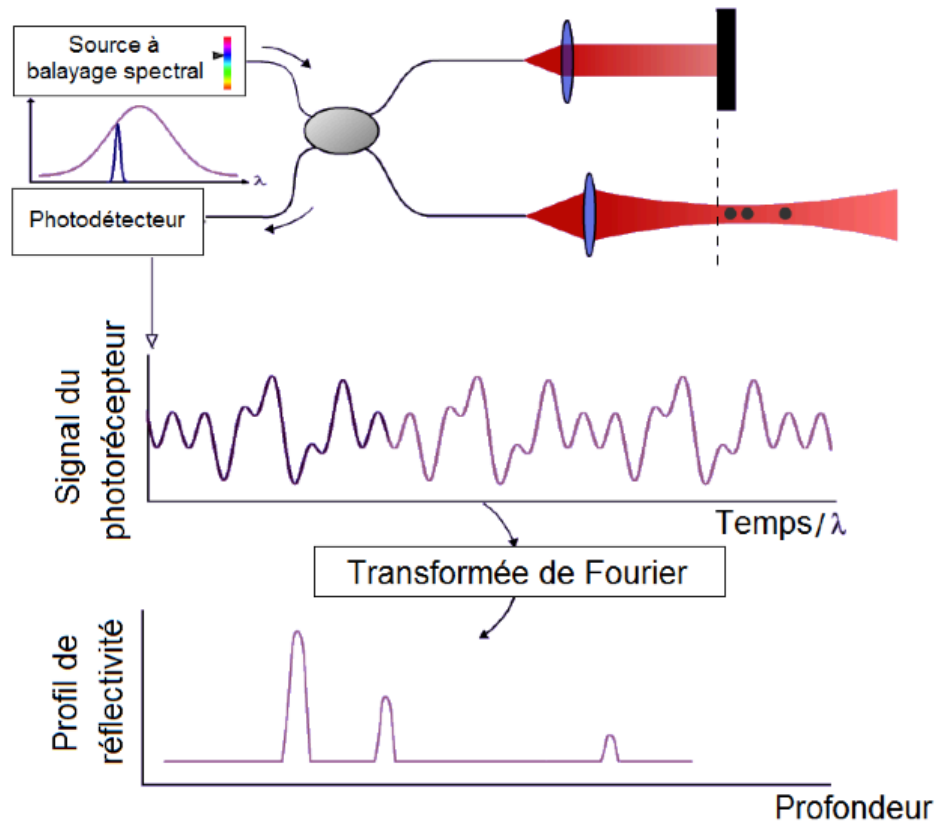


Figure 1.15 Schéma du fonctionnement d'OCT dans le domaine spectral (SD-OCT) (image reproduite avec permission du LODI)

### 1.5.4 L'OCT Doppler

En plus d'obtenir des informations structurales sur les échantillons, l'OCT est en mesure de détecter des mouvements dans l'échantillon. En effet, des décalages en fréquence seront induits par le mouvement d'un diffuseur qui se déplace dans la direction du faisceau laser. On peut caractériser ces déplacements en utilisant l'OCT en mode Doppler, schématisé à la Figure 1.16.

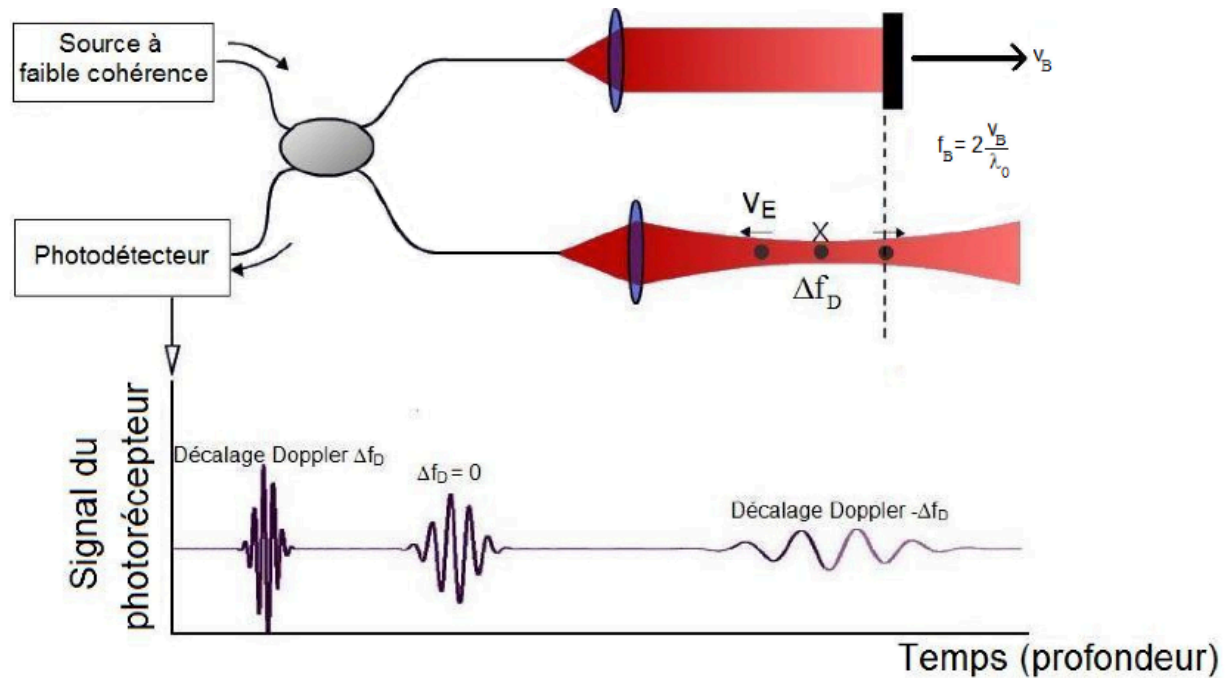


Figure 1.16 Schéma du fonctionnement d'OCT Doppler (TD-OCT) (image reproduite avec permission du LODI)

Dans le mode Doppler en OCT dans le domaine temporel, on observe un changement de la fréquence du signal  $f_D$  reçu en fonction de la vitesse  $v$  du diffuseur. Ce décalage Doppler dépend de la longueur d'onde. Il est important de noter que seule la composante de la vitesse parallèle à l'onde incidente (composantes pour lesquelles  $\theta = 0$ ) génère un décalage fréquentiel. On peut exprimer cette variation de la fréquence comme suit :

$$f_D = \frac{2v \cos \theta}{\lambda_0}. \quad (1.17)$$

En FD-OCT, la fréquence porteuse n'est pas accessible puisqu'il n'y a pas de balayage du miroir de référence. Ainsi, la fréquence Doppler ne peut être estimée à l'aide d'une mesure sur une seule ligne. Pour accéder à la fréquence Doppler en FD-OCT, il faut comparer l'évolution de l'interférogramme entre deux acquisitions subséquentes de la même ligne. La différence  $\Delta(z, \tau)$  entre l'interférogramme au même endroit à deux moments différents est donnée par:

$$f_D(z) = \frac{\Delta(z, \tau)}{2\pi\tau}. \quad (1.18)$$

Dans ce projet, nous nous intéresserons particulièrement au flux sanguin dans des capillaires, que nous déterminons en suivant le mouvement de l'hémoglobine qui agit comme diffuseur. Ce que nous obtenons à l'aide de l'OCT est la composante de la vitesse dans la direction du flux, soit  $\bar{v}_z = \cos(\theta)\bar{v}$ , où  $\theta$  est l'angle du capillaire.

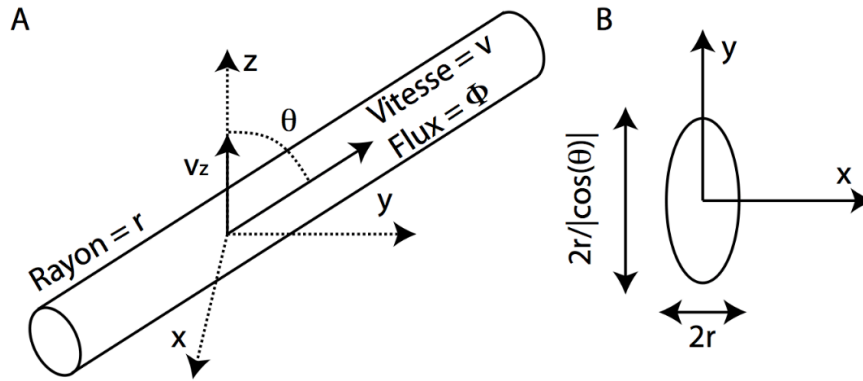


Figure 1.17 Flux sanguin dans un capillaire. A) Représentation schématique d'un capillaire. B) Coupe du capillaire (surface elliptique) dans le plan perpendiculaire à la lumière (tiré de Baraghis, 2011)

Nous pouvons déduire l'angle du vaisseau à partir de l'ellipticité de la coupe du capillaire dans le plan perpendiculaire à la lumière. L'aire de la coupe du capillaire est alors de  $A = \frac{\pi r^2}{\cos(\theta)}$ . Sachant que la vitesse moyenne dans un capillaire est de  $\bar{v} = \frac{\phi}{\pi r^2}$ , on peut alors obtenir le flux sanguin à partir de la somme de la vitesse verticale sur la coupe du capillaire :

$$\phi = \sum_A v_z(x, y) = \frac{\pi r^2}{\cos(\theta)} \cos(\theta) \bar{v} \quad (.19)$$

## 1.6 L'endoscopie pour l'imagerie optique

L'imagerie optique peut permettre d'imager avec une très bonne résolution spatiale, mais avec une profondeur de pénétration limitée. Pour surmonter cette limitation, il est possible de faire appel à l'endoscopie. La taille de l'endoscope varie selon l'application visée. Pour l'imagerie de voies naturelles telles que l'œsophage, le diamètre de l'endoscope peut être de l'ordre du centimètre, alors qu'elle doit être inférieure au millimètre dans le cas de l'imagerie du cerveau. Pour d'aussi petits diamètres, il est préférable d'utiliser de la fibre optique ou des lentilles à

gradient d'indice (GRIN) plutôt que des lentilles conventionnelles. Les prochains paragraphes décriront en détail les avantages, inconvénients et paramètres à considérer lors de la conception d'un endo-microscope pour l'imagerie du cerveau conçu à l'aide de GRIN ou de fibre optique.

### **1.6.1 Faisceaux de fibres optiques**

L'utilisation de fibres pour l'endoscopie présente certains avantages, comme une grande flexibilité. Elles peuvent aussi avoir n'importe quelle longueur, alors que les GRIN doivent avoir un intervalle de longueur bien défini.

La résolution d'un endoscope fibré est limitée par le nombre de fibres qui le composent. Chaque fibre correspond à un pixel. Pour les applications médicales, les faisceaux de fibres ont typiquement un diamètre de 0.25mm à 3mm et comportent de 3000 à 100000 fibres (Niederer et al., 2001). La taille des fibres individuelles est généralement supérieure à 2  $\mu\text{m}$  et est limitée, entre autres, par la longueur d'onde à transmettre. Plus les fibres sont entassées, plus il y a de risques de couplages réciproques (*crosstalk*). La performance des endoscopes fibrés est ainsi plus particulièrement limitée pour de petits diamètres en raison du nombre de fibres et du couplage réciproque.

### **1.6.2 Lentilles à gradient d'indice (GRIN)**

Les lentilles à gradient d'indice sont cylindriques, et permettent de focaliser la lumière à l'aide d'un gradient d'indice de réfraction plutôt qu'à l'aide d'un rayon de courbure.

Les lentilles à gradient d'indice permettent d'avoir une meilleure résolution que les endoscopes fibrés. Les principaux inconvénients des GRIN sont qu'elles sont rigides, et que leur transmission est moins uniforme que celle des endoscopes fibrés. En effet, la lumière dévie de l'approximation paraxiale sur tout le chemin optique. La luminosité diminue également vers les bords de l'image, en raison du cône d'acceptance qui rapetisse lorsqu'on s'éloigne de l'axe optique (Niederer et al., 2001). Les GRIN conviennent mieux si l'application visée requiert ou permet un endoscope rigide et court.

Il est intéressant d'utiliser des GRIN plutôt que des lentilles conventionnelles pour de petits diamètres. Pour les lentilles conventionnelles, le focus est dépendant de la forme de la lentille. Il



est donc difficile et coûteux de fabriquer des lentilles miniatures possédant une petite longueur focale et minimisant les aberrations. La figure ci-dessous illustre bien cela.

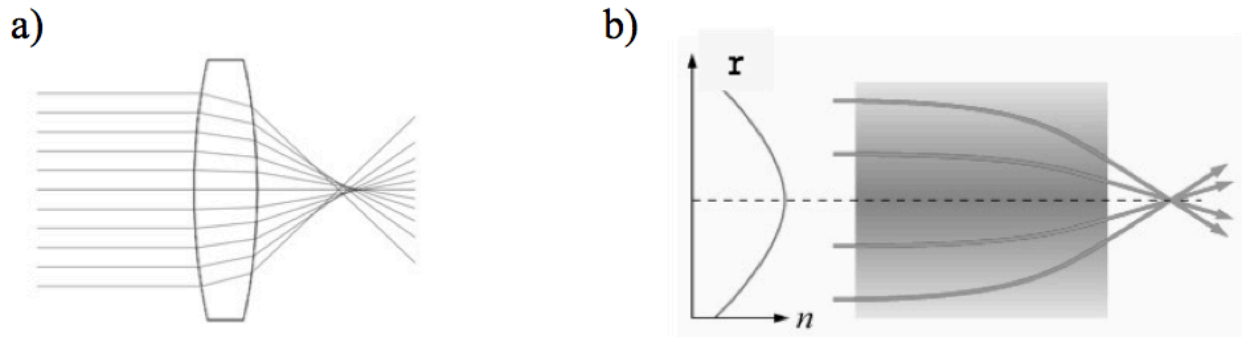


Figure 1.18 a) micro lentille conventionnelle qui focalise la lumière grâce à son rayon de courbure. b) lentille à gradient d'indice qui focalise la lumière grâce à la variation de son indice de réfraction ("Gradient-index optics," 2014)

Voici quelques bases importantes par rapport au fonctionnement d'une lentille à gradient d'indice. D'abord, la variation de l'indice de réfraction se fait paraboliquement comme une fonction du rayon ( $r$ ) de la lentille à gradient d'indice (Gomez-Reino, Perez, & Bao, 2002):

$$n_r = n_0 \left( 1 - \frac{A}{2} r^2 \right). \quad (1.20)$$

Dans cette équation,  $n_0$  est l'indice de réfraction sur l'axe optique, alors que  $n_r$  est l'indice à une distance  $r$  de l'axe et  $A$  est une constante positive. Lors de sa propagation dans la lentille, la lumière suit une trajectoire sinusoïdale dont la période (*pitch*) illustrée à la Figure 1.19 est donnée par :

$$P = \frac{2\pi}{\sqrt{A}}. \quad (1.21)$$

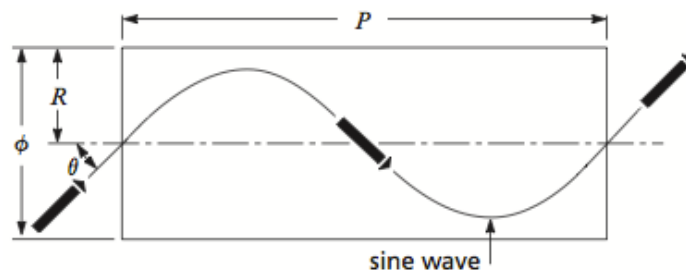


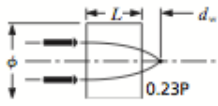
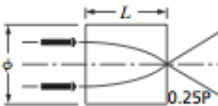
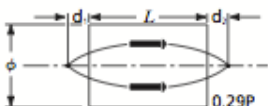
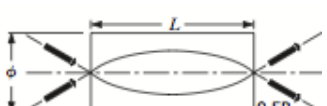
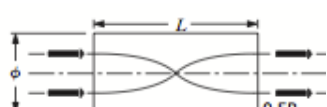
Figure 1.19 Propagation de la lumière dans une GRIN (tiré de CVI Melles Griot, n.d.)

Il est important de noter que selon les paramètres de fabrication de la GRIN (indice de réfraction, rayon  $r$ , etc.), l'angle maximal pour lequel la lumière incidente peut traverser la lentille est donné par :

$$\theta = \sin^{-1}(n_0 r \sqrt{A}). \quad (1.22)$$

Il est important de choisir la longueur de la lentille à gradient d'indice en fonction de l'application souhaitée. En effet, selon la fraction de période que possède la lentille, la lumière pourra être focalisée directement à la sortie de la GRIN (0.25P), ou bien à une certaine distance de sa dernière face (0.23P). La longueur de la GRIN permet aussi de déterminer comment doit arriver la lumière à l'entrée de la GRIN : si elle doit arriver collimée ou focalisée. Le Tableau 1.1 illustre quelques-unes des différentes options possibles.

Tableau 1.1 Différentes longueurs de GRIN et leurs applications (CVI Melles Griot, n.d.)

Période	Chemin optique	Image résultante
0.23P		La lumière collimée est focalisée à l'extérieur de la GRIN
0.25P		Image réelle inversée à la sortie de la GRIN d'un objet à l'infini
0.29P		Image d'une source ponctuelle en un point focal à l'extérieur de la GRIN
0.5P		Transfert d'une image réelle inversée d'un bout à l'autre de la GRIN
0.5P		Transfert de la lumière collimée d'un bout à l'autre de la GRIN avec inversion

Finalement, il est à noter que plus l'indice de réfraction de la lentille est élevé, plus l'ouverture numérique est élevée. Cela peut également engendrer davantage d'aberrations.

## 1.7 Combinaison de l'OCT et de la microscopie confocale

Maintenant que nous avons vu les fondements de l'OCT et de la microscopie confocale, nous passerons brièvement en revue la littérature sur la combinaison de ces deux techniques.

Depuis plusieurs années, la combinaison de l'OCT et de la microscopie confocale est exploitée en ophtalmologie, sous le nom de OCT/SLO (A.G. Podoleanu & Jackson, 1998). En effet, ces deux techniques permettent d'obtenir de l'information tomographique et topographique à haute résolution. L'OCT permet dans cette technique d'obtenir une meilleure résolution en profondeur

(Adrian Gh. Podoleanu & Jackson, 1999). Cela permet d'améliorer les diagnostics ainsi que la compréhension des pathologie maculaires (Castro Lima et al., 2011). Pour cette technique, une seule source lumineuse est utilisée (typiquement une SLED à 820 nm) et le signal est obtenu en microscopie confocale en redirigeant une partie du signal de l'OCT. Un compromis doit donc être réalisé quant à l'intensité du signal collecté pour chacune des modalités.

Pour pouvoir bénéficier des avantages de la microscopie confocale en fluorescence, tels que l'identification de structures spécifiques ou bien l'étude fonctionnelle de mécanismes comme l'activation neuronale, il est nécessaire de pouvoir imager à différentes longueurs d'onde en microscopie confocale. Pour ce faire, il est possible d'utiliser différentes sources et plusieurs miroirs dichroïques pour séparer les différentes longueurs d'ondes. L'imagerie à différentes longueurs d'ondes à l'aide d'OCT et de microscopie confocale a par exemple permis d'obtenir simultanément des informations structurelles et moléculaires utiles à la détection de polypes dans le colon (Bradú, Ma, Bloor, & Podoleanu, 2009; Yuan et al., 2010).

L'étude de plusieurs pathologies *in vivo* nécessite d'accéder aux tissus plus en profondeur. Pour permettre l'imagerie en profondeur à l'aide d'OCT et de microscopie confocale, le groupe de Gmitro propose un microendoscope fibré (Madore et al., 2013; Makhoulf, Rouse, & Gmitro, 2011; Risi, 2014). Toutefois, l'utilisation d'un faisceau de fibres optiques pour cette application présente une perte de sensibilité significative due au couplage réciproque entre les fibres du faisceau (Risi, 2014). De plus, la configuration proposée dans ce travail ne permet pas d'ajuster l'ouverture numérique automatiquement selon la modalité d'imagerie utilisée. Tel que nous l'expliquerons dans la section de conception, la microscopie confocale requiert une ouverture numérique élevée pour maximiser sa résolution spatiale alors que l'OCT requiert une faible ouverture numérique pour maximiser la profondeur d'imagerie.

## PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

### 1.8 Résumé de la problématique

Différents groupes étudient les mécanismes sous-tendant les crises d'épilepsie. Ils cherchent à comprendre entre autres le rôle des neurones dans ces processus épileptiques et l'impact de mutations sur le développement de la circuiterie cérébrale. Pour ce faire, ils utilisent généralement une combinaison de génétique ciblée, d'enregistrements EEG *in vivo*, d'électrophysiologie, d'IRM et de microscopie *in vitro* sur des tranches corticales. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas de visualiser l'activité de neurones individuels tout en départageant les paramètres de connectivité lors de crises électriques *in vivo*. Afin de progresser dans l'étude de cette pathologie et de plusieurs autres, il existe un besoin important pour une technique d'imagerie alliant une résolution micrométrique à une profondeur de pénétration de quelques centimètres. L'étude du système visuel et la compréhension de plusieurs pathologies du cerveau, notamment la schizophrénie, le Parkinson, la maladie d'Alzheimer, bénéficieraient grandement d'un tel système d'imagerie. En effet, les méthodes actuelles d'imagerie n'ont pas la résolution et la profondeur de pénétration nécessaires pour visualiser des neurones ainsi que leur activité dans le cortex profond (Logothetis, 2008; Pichler, Wehrl, & Judenhofer, 2008).

### 1.9 Hypothèses de recherche

Ce projet repose d'abord sur l'hypothèse selon laquelle la microscopie confocale en fluorescence possède la résolution nécessaire afin de visualiser directement des neurones individuels ainsi que leur activité. Plusieurs études ont permis d'étudier cela, ce qui nous laisse croire qu'il sera possible de faire de même dans ce projet (Patolsky et al., 2006; Yu, Bultje, Wang, & Shi, 2009).

Il repose également sur l'hypothèse stipulant que l'OCT Doppler permet d'observer l'activité hémodynamique de neurones du cerveau murin. Cela a été réalisé avec succès par plusieurs groupes de recherche (Baraghis et al., 2011; Chen et al., 2009; Srinivasan et al., 2009; Yaseen et al., 2011).

Finalement, ce projet suppose qu'il est possible de combiner la microscopie confocale et l'OCT sans que cela n'affecte significativement la qualité des images obtenues avec chaque modalité. Des résultats concluants ont été obtenus depuis plusieurs années à cet égard, en particulier en

ophtalmologie (A.G. Podoleanu & Jackson, 1998). Le présent projet requiert également qu'il soit possible de combiner les deux modalités à travers un microendoscope. Cela n'a pas encore été réalisé aux longueurs d'onde ciblées dans ce projet et pour le type d'endoscope proposé. Toutefois, il a été démontré qu'il est possible d'obtenir des résultats prometteurs en combinant l'OCT et la microscopie confocale à travers un endoscope fibré (Madore et al., 2013; Makhoulouf & Gmitro, 2011; Risi, 2014). Il a également été démontré qu'il est possible d'utiliser des lentilles à gradient d'indice pour réaliser de l'endo-microscopie à l'aide de microscopie confocale ou bien d'OCT (Jung et al., 2010; P. Kim, Puoris'haag, Côté, Lin, & Yun, 2008).

## 1.10 Question et objectifs de recherche

Dans le cadre de ce projet de recherche, nous tenterons de répondre à la question suivante afin d'apporter une solution à la problématique décrite ci-haut :

*Comment imager des phénomènes neuronaux et hémodynamiques in vivo à une profondeur de quelques centimètres et avec une résolution cellulaire?*

Le but de ce travail est de concevoir un endoscope adapté à l'imagerie de l'activité neuronale et hémodynamique du cerveau. Les modalités idéales à combiner pour cette application sont la microscopie confocale en fluorescence, qui permet d'imager l'activité de neurones individuels, et l'OCT Doppler, qui permet de visualiser l'activité hémodynamique en profondeur. Un tel endoscope devra posséder un diamètre inférieur à 1 mm pour limiter les dommages aux tissus. Il devra également permettre de pénétrer à une profondeur de quelques centimètres dans le tissu afin d'imager différentes parties du cerveau. Finalement, il devra permettre de conserver une résolution de l'échelle cellulaire et minimiser les aberrations.

### 1.10.1 Objectifs spécifiques:

- 1) Concevoir un microscope confocal en fluorescence et le combiner à un système d'OCT Doppler à travers un bras d'imagerie flexible
- 2) Concevoir un endoscope permettant d'imager en profondeur de manière minimalement invasive à l'aide des deux microscopes;
- 3) Caractériser les différentes parties du système en termes de résolution et de sensibilité;

4) Imager le cortex de souris pour en discerner la vasculature.

## **1.11 Structure du mémoire**

Maintenant que nous avons décrit les objectifs de ce projet ainsi que les fondements de l'épilepsie et des modalités d'imagerie utilisées pour l'imager, nous présenterons à la section suivante les différents paramètres de conception. Nous présenterons d'abord le design et le matériel utilisé pour concevoir le microscope confocal. Nous ferons ensuite de même pour le système OCT et l'endoscope. Nous expliquerons enfin comment les deux microscopes sont combinés à travers l'endoscope. Le système expérimental sera également détaillé.

La section subséquente présentera et discutera les résultats obtenus *ex vivo* et *in vivo* obtenus à l'aide du microscope confocal et de l'OCT avec et sans l'endoscope. La dernière section conclura alors ce mémoire en rappelant les objectifs et les résultats puis en proposant des améliorations et applications possibles.

## CHAPITRE 2 CONCEPTION

Cette section traitera des différents aspects de design optique, mécanique et logiciel qui ont permis de réaliser un endo-microscope combinant la microscopie confocale en fluorescence et la tomographie par cohérence optique Doppler. Nous présenterons d'abord les paramètres et pièces choisis pour réaliser le microscope confocal en fluorescence. Nous ferons alors de même pour le système d'OCT Doppler, puis pour l'endoscope. Nous expliquerons alors comment seront combinés les deux microscopes à travers l'endoscope. Ce chapitre sera conclu par une présentation du système expérimental développé pour l'imagerie du cerveau de petit animal avec l'endo-microscope.

### 2.1 Design du microscope confocal en fluorescence

Le design ainsi que les pièces choisies pour l'illumination, le balayage et la détection du microscope confocal en fluorescence sont décrits dans la sous-section qui suit. Le schéma du montage de microscopie confocale en fluorescence est présenté à la Figure 2.1. Une liste détaillée des pièces peut quant à elle être trouvée à l'Annexe 1.

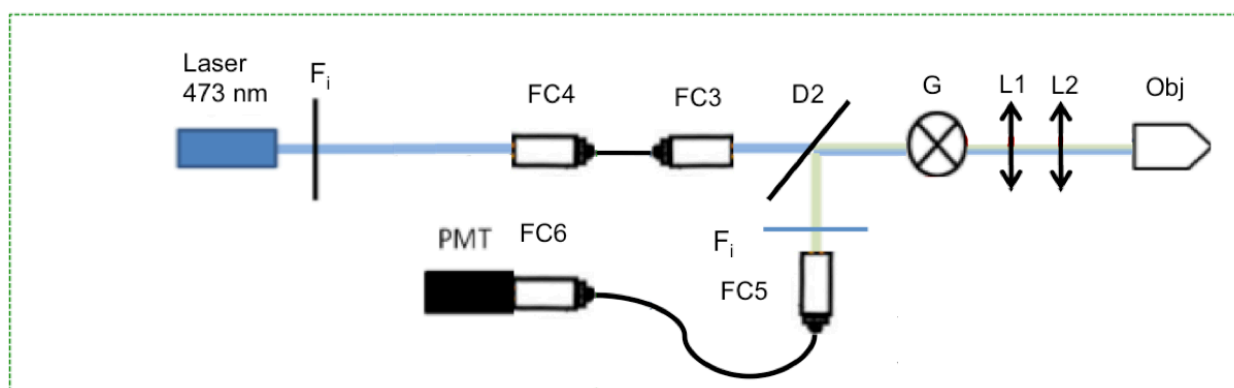


Figure 2.1 Schéma du montage de microscopie confocale en fluorescence. FC3-6: collimateurs de fibres, G: galvanomètres, L1-2: lentilles du télescope, D2: miroir dichroïque, Fi: filtres, PMT: photomultiplicateur, Obj: objectif de microscope.

#### Illumination

Pour imager l'activité neuronale à l'aide de marqueurs du calcium (Oregon Green Bapta-1), on doit exciter les marqueurs proche de 488 nm. Un laser à cette longueur d'onde étant plus dispendieux, nous avons utilisé un laser à 473 nm qui excite tout de même bien le fluorophore



(UltraLasers, DHOM-L-473-50). Deux miroirs dans une monture permettent de contrôler l'angle du faisceau en vue de son injection dans une fibre monomode. Cette injection est réalisée à l'aide d'un stage d'alignement 3 axes et d'un objectif. Un filtre positionné à la sortie du faisceau permet également d'avoir une illumination bien centrée à 473 nm.

### **Balayage**

Le balayage de l'échantillon est réalisé grâce à des miroirs galvanométriques deux axes (Thorlabs, GCM002), un télescope et un objectif. Le télescope télécentrique est composé de lentilles de  $f_1 = 60$  mm et  $f_2 = 25$  mm. La lentille  $f_1$  est positionnée à la distance focale des miroirs galvanométriques. La lentille  $f_2$  est quant à elle placée à une distance de  $f_1 + f_2$  de la première lentille. L'objectif corrigé à l'infini (Olympus 20x, 0.4 NA) est finalement positionné à une distance  $f_2$  de la deuxième lentille.

### **Détection**

L'émission de fluorescence se fait autour de 520 nm. Les deux longueurs d'ondes sont séparées à l'aide d'un filtre dichroïque. Le signal de fluorescence est dirigé vers un collimateur et une fibre multimode puis détecté à l'aide d'un tube photomultiplicateur (Thorlabs, PMM02).

Le rôle des sténopés d'illumination et de détection est ici rempli par les fibres, tel que l'illustre la Figure 2.2. Le choix de la taille de la fibre de détection requiert un compromis entre la collection de signal et la résolution axiale. Les paramètres résultant de ce compromis pour les fibres utilisées dans ce montage sont expliqués et décrits ci-dessous.

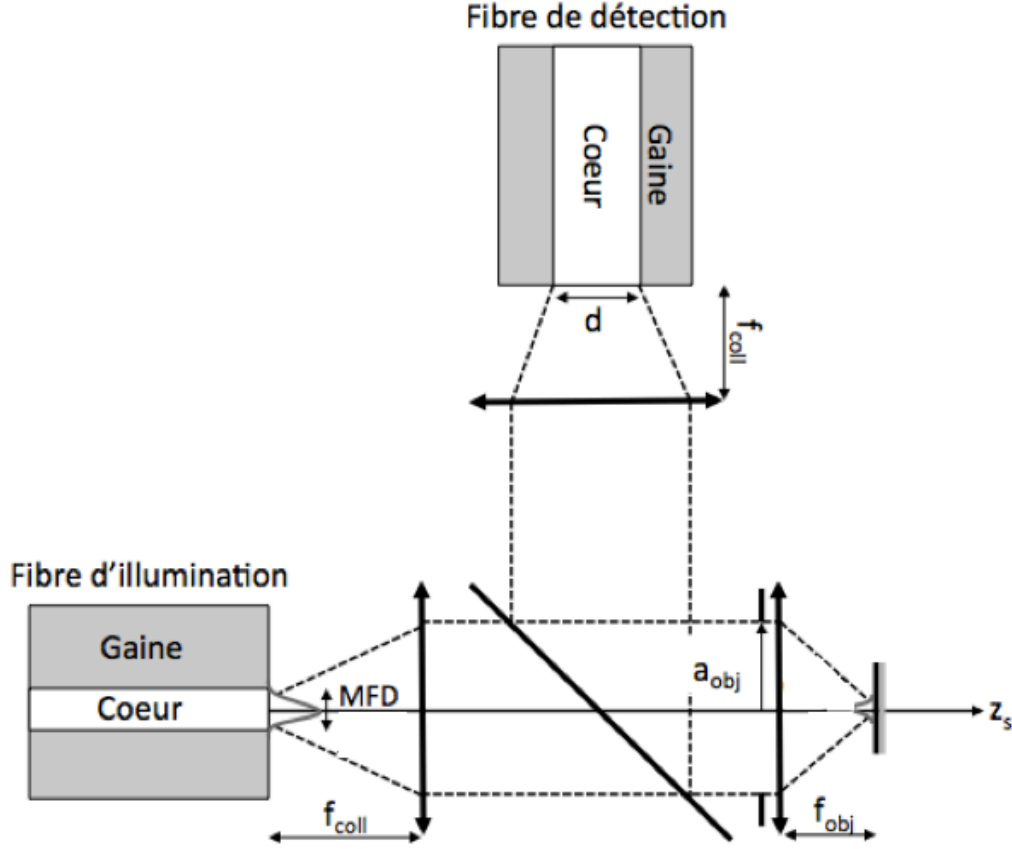


Figure 2.2 Imagerie confocale en fluorescence avec une fibre pour l'illumination et une fibre pour la détection.  $d$  : diamètre du cœur de la fibre de détection, MFD : diamètre de champ de mode (*mode field diameter*),  $f_{coll}$  : distance focale de la lentille de collimation,  $f_{obj}$  : distance focale de l'objectif,  $a_{obj}$  : rayon de la pupille.

Définissons  $v_p$ , le rayon normalisé du sténopé en unités optiques (où  $1 \text{ u.o.} = \frac{\lambda}{2\pi NA}$ ). L'intensité collectée en fonction du défocus pour différentes valeurs de  $v_p$  est la suivante (Gu, 1996):

$$I(u) \propto \int_0^{v_p} \left| \int_0^1 P_1(\rho) P_2(\rho) \exp(iu\rho^2) J_0(v\rho) \rho d\rho \right|^2 v dv. \quad (2.1)$$

Où  $v_p$  peut être exprimé comme :

$$v_p = \frac{d}{MFD} \sqrt{2A}. \quad (2.2)$$

On peut remarquer à la Figure 2.3 que pour des valeurs de  $d/MFD$  supérieures à 5, l'efficacité d'excitation  $\eta$  reste sensiblement la même. Pour collecter suffisamment de signal et avoir un bon sectionnement optique, nous rechercherons donc une valeur de  $v_p$  d'environ 5.

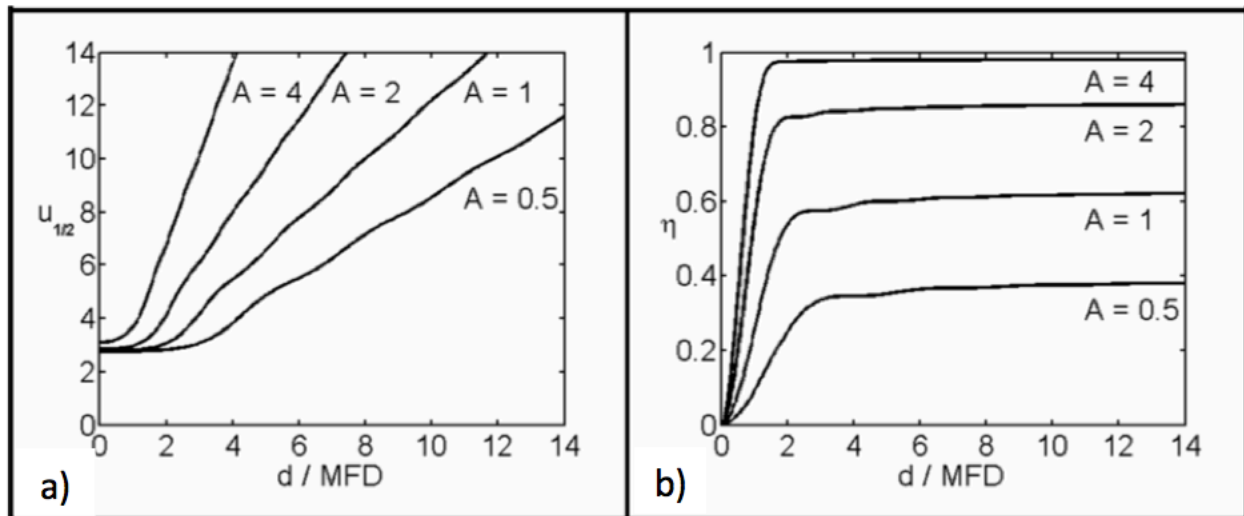


Figure 2.3 a) Sectionnement optique ( $u_{1/2}$ ) pour un plan parfaitement réfléchissant en fonction du ratio  $d/MFD$  pour différentes valeurs de remplissage de pupille ( $A$ ). b) Efficacité d'excitation  $\eta$  pour un plan parfaitement réfléchissant au focus ( $u=0$ ) en fonction du ratio  $d/MFD$  pour différentes valeurs de  $A$ . (tiré de Lemire-Renaud, Strupler, Benboujja, Godbout, & Boudoux, 2011)

En microscopie confocale, on veut remplir la pupille d'objectif pour maximiser l'ouverture numérique, et donc avoir  $A=1$ . En considérant cela, on peut évaluer la valeur de  $v_p$  pour différentes options de fibres de détection commercialement disponibles. Il est à noter que pour conserver seulement le mode fondamental à l'émission, une fibre ayant un MFD de  $3.5 \mu\text{m}$  a été sélectionnée.

Tableau 2.1 Rayon du sténopé en fonction des fibres d'émission et de détection sélectionnées

Cœur de la fibre de détection ( $d$ )	MFD d'émission <sup>1</sup>	$v_p$
10 $\mu\text{m}$	3.5 $\mu\text{m}$	2.86
25 $\mu\text{m}$	3.5 $\mu\text{m}$	7.14
50 $\mu\text{m}$	3.5 $\mu\text{m}$	14

<sup>1</sup> MFD donné par Thorlabs pour 515 nm

On peut déduire à partir du Tableau 2.1 que l'utilisation d'une fibre de détection de 50  $\mu\text{m}$  de diamètre ne permettra pas d'avoir la qualité de sectionnement optique attendue en microscopie confocale. La fibre de 25  $\mu\text{m}$  de diamètre permettrait quant à elle d'avoir un sectionnement optique adéquat tout en conservant une quantité suffisante de signal. Les expériences conduites dans le cadre de ce projet ont été réalisées à l'aide de fibres multimodes de 25  $\mu\text{m}$  et 50  $\mu\text{m}$ , selon les besoins en terme de signal et de sectionnement optique. Finalement, le contrôle de ce microscope est réalisé à l'aide d'une interface Matlab.

## 2.2 Design du système d'OCT Doppler

Nous décrirons dans cette section les pièces utilisées pour la conception du système d'OCT Doppler, en allant de l'illumination aux bras de référence et d'imagerie pour terminer par la détection. Un schéma du montage est présenté à la Figure 2.4.

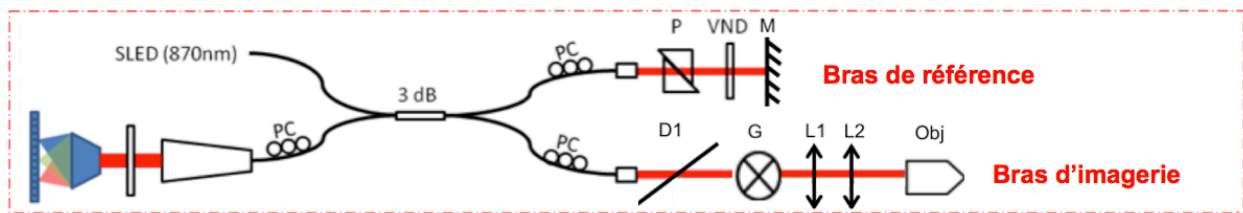


Figure 2.4 Schéma du montage d'OCT Doppler. PC: contrôleur de polarisation, P: prismes, VND: filtre à densité neutre variable, M: miroir, G: galvanomètres, L1-2: lentilles, D1: miroir dichroïque, Obj: objectif de microscope, SLED: diode superluminescente. (tiré de Baraghis et al., 2011)

### Illumination

Le système d'OCT Doppler dans le domaine fréquentiel utilisé a été modifié à partir du système présenté par (Baraghis et al., 2011). Le système est basé sur une diode superluminescente (SLED) ayant une longueur d'onde centrale de 870 nm, une largeur spectrale de 65 nm et une puissance de 2.5 mW (Exalos EXS8710-2411, Langhorne, PA). La lumière de cette SLED est envoyée vers un coupleur 50/50 (composé de fibre HI780 de Corning et de connecteurs FC-APC), qui divise l'illumination entre un bras de référence et un bras d'imagerie.

### Bras de référence

La dispersion du bras d'échantillon est compensée dans le bras de référence à l'aide de deux prismes de verre (BK-7) permettant de changer la quantité de verre en les déplaçant l'un contre

l'autre à l'aide d'huile. Ces prismes pré-compensent pour la dispersion du miroir dichroïque, des lentilles du télescope, de l'objectif de microscope et éventuellement de la GRIN lorsque le montage est combiné à l'endoscope. L'intensité du signal dans le bras de référence peut être contrôlée à l'aide d'un filtre à densité neutre variable (VND). La lumière réfléchie par le miroir du bras de référence est renvoyée vers le coupleur.

### **Bras d'imagerie**

Le bras allant vers l'échantillon est composé d'un télescope, dont la longueur a été minimisée pour maximiser la flexibilité du bras d'imagerie ( $f_1=25\text{mm}$  et  $f_2=60\text{mm}$ ). Plutôt que d'imager l'échantillon à l'aide d'un objectif de microscope standard, une lentille achromate (Thorlabs AC254-030-B-ML) est utilisée pour focaliser sur l'endoscope comme il sera montré à la prochaine section. Le balayage du faisceau laser sur l'échantillon est réalisé à l'aide de miroirs galvanométriques deux axes (Thorlabs). Le signal réfléchi par l'échantillon retourne vers le coupleur pour interférer avec celui du bras de référence.

### **Détection**

Le signal d'interférence ainsi obtenu est dirigé vers le détecteur, soit un spectromètre ayant une caméra de 2048 pixels (Basler Sprint spL2048-140k, Exton, PA). Ce détecteur permet d'obtenir en théorie une vitesse d'acquisition de 67k lignes A par seconde. Toutefois, le disque dur de l'ordinateur utilisé limite la vitesse d'acquisition à 15k lignes A par seconde. Une interface conçue en Labview est utilisée pour contrôler le système OCT.

## **2.3 Design de l'endoscope GRIN**

Pour réaliser un système optique à base de lentilles GRIN permettant de relayer la lumière d'un objectif de microscope à l'échantillon, plusieurs options sont possibles. D'une part, on peut utiliser une configuration en doublet (une association de deux lentilles), composée d'une lentille de relais à faible ouverture numérique et d'une lentille d'imagerie qui focalisera la lumière sur l'échantillon. Dans ce cas, l'objectif utilisé pour coupler la lumière dans l'endoscope devra comporter une ouverture numérique compatible à celle du relais. Une autre option est l'utilisation d'un triplet, qui est composé d'une lentille de couplage et d'un doublet. Cette configuration permet d'utiliser un objectif de microscope typiquement utilisé pour un microscope confocal ou un système OCT grâce à l'ouverture numérique assez élevée de la lentille de couplage. Nous avons utilisé les deux designs, présentés à la Figure 2.5, dans le cadre de ce projet.

Le design du doublet est plus simple. Le fait de pouvoir utiliser une lentille achromate plutôt qu'un objectif de microscope a pour effet de réduire les rétro-réflexions de l'objectif qui ne peut pas avoir un revêtement adapté à la fois aux longueurs d'ondes du microscope confocal et à celles de l'OCT. L'utilisation du triplet augmente toutefois la flexibilité du système, puisqu'on peut passer plus facilement d'un système d'endo-microscopie à un microscope standard.

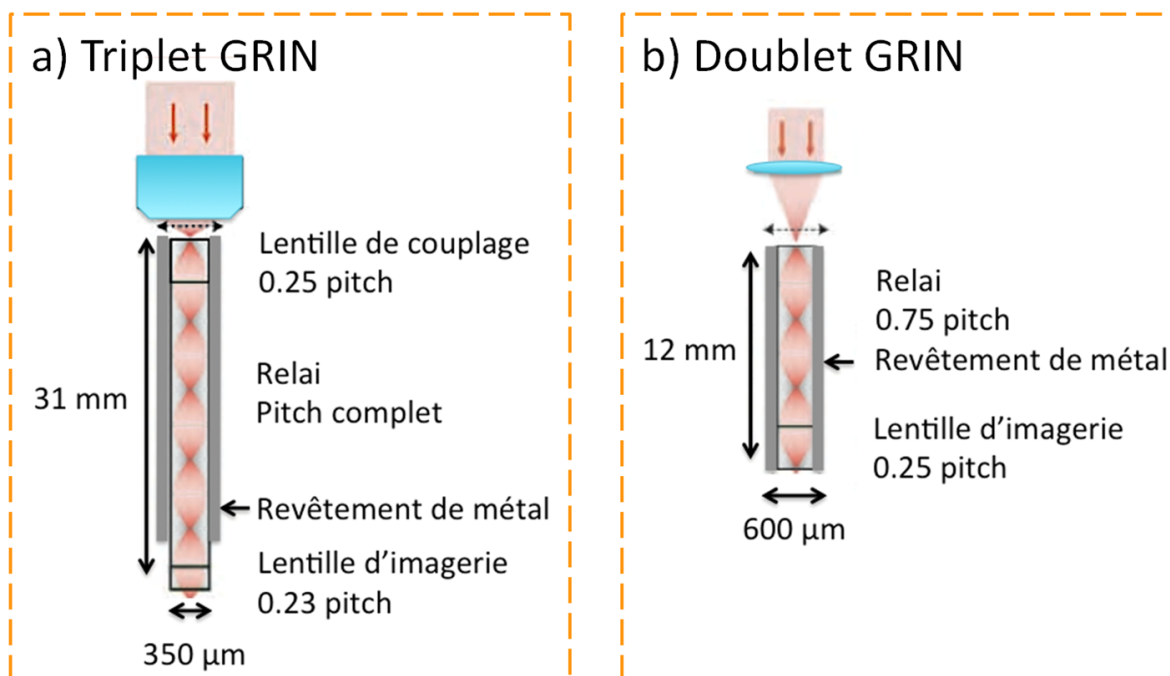


Figure 2.5 Designs retenus pour l'endoscope. A) triplet GRIN B) doublet GRIN.

Les paramètres des endoscopes ont été choisis de manière à limiter au maximum les dommages causés aux tissus ainsi que les aberrations, tout en permettant de pénétrer assez profondément dans les tissus pour atteindre le cortex. Les impacts de différents paramètres de conception d'un endoscope GRIN sur la qualité des images obtenues sont résumés au Tableau 2.2.

Tableau 2.2 Impact de différents paramètres de conception d'un endoscope GRIN sur la qualité de l'image obtenue

Paramètre	Impact
↗ NA de la lentille d'imagerie	↗ résolution
↗ NA du relais	↗ champ de vue ↗ aberrations
↗ longueur du relais	↗ aberrations ↗ profondeur de pénétration dans les tissus
↗ largeur de l'endoscope	↗ dommages aux tissus ↗ champ de vue
↗ revêtement de métal	↗ rigidité ↗ largeur de la sonde

La lentille relais choisie possède une ouverture numérique assez faible pour minimiser les aberrations, mais assez élevée pour permettre un champ de vue d'au moins 90  $\mu\text{m}$ . Le diamètre de l'endoscope utilisé est le plus petit disponible commercialement, afin de minimiser les dommages dans les tissus. Afin d'améliorer la rigidité du design, nous avons recouvert les lentilles d'un revêtement de métal. Pour minimiser les dommages aux tissus, nous avons choisi de ne pas revêtir le triplet de revêtement métallique à son extrémité. Le revêtement sur le reste du triplet améliore déjà significativement la rigidité de cet endoscope. On obtient en résumé les spécifications au Tableau 2.3.

Tableau 2.3 Spécifications de l'endoscope pour le design de triplet

Spécification	Valeur
Champ de vue	90 $\mu\text{m}$
Ouverture numérique du relais	0.119
Ouverture numérique de la lentille d'imagerie et de couplage	0.6
Diamètre de la GRIN	350 $\mu\text{m}$
Diamètre externe du revêtement de métal	600 $\mu\text{m}$
Résolution latérale	1 $\mu\text{m}$

## 2.4 Combinaison du microscope confocal et de l'OCT dans l'endoscope

Pour réaliser l'endo-microscope, les montages de microscopie confocale et d'OCT Doppler présentés précédemment ont été combinés. La Figure 2.6 illustre schématiquement le système complet. Chaque faisceau est relayé par fibre optique jusqu'au bras d'imagerie, collimé, puis envoyé vers un miroir dichroïque permettant de combiner les deux bandes de longueurs d'onde sur les miroirs galvanométriques. Les faisceaux sont alors dirigés vers un télescope commun, dont les lentilles sont adaptées pour les deux bandes de longueur d'onde (revêtement VIS-NIR, Edmunds Optics). À la sortie du télescope, un objectif de microscope ou une lentille achromate focalise la lumière sur un endoscope composé de lentilles GRIN, qui servent de relais à la lumière et d'objectif pour imager l'échantillon. Le diamètre de 350 $\mu$ m de la GRIN est assez petit pour être inséré dans une canule et ainsi limiter les dommages au cerveau. Le signal réfléchi par l'échantillon est dirigé vers les fibres menant au bon microscope par des miroirs dichroïques. L'endoscope, le télescope, les miroirs galvanométriques et dichroïques sont intégrés dans un bras mobile pouvant être déplacé au-dessus de l'animal sans encombrer la plateforme d'expérimentation *in vivo*.



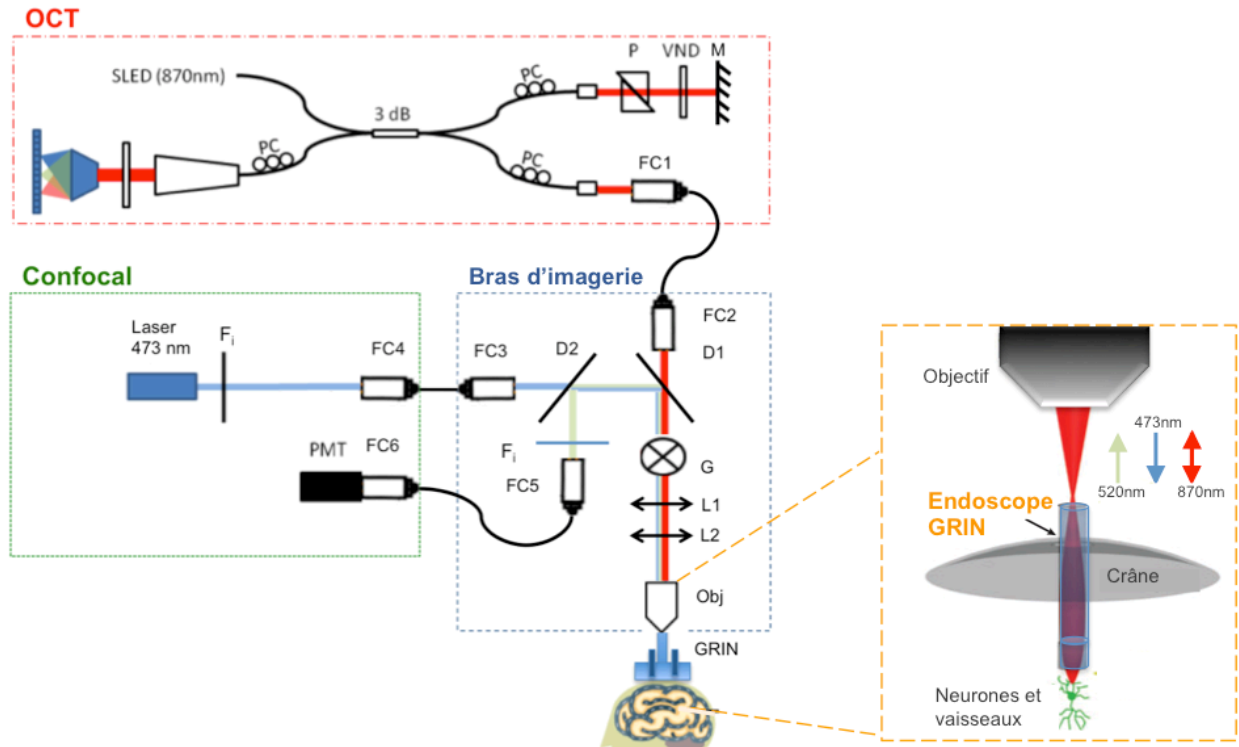


Figure 2.6 Montage de l'endo-microscope combinant l'OCT et la microscopie confocale

FC1-4: collimateurs de fibres, PH: pinhole, PC: contrôleur de polarisation, P: prismes, VND: filtre à densité neutre variable, M: miroir, G: galvanomètres, L1-3: lentilles, D1-2: miroirs dichroïques, Fi: filtres, PMT: photomultiplicateur, Obj: objectif de microscope, SLED: diode superluminescente.

### Choix de l'objectif et contrôle de la distance de Rayleigh

La microscopie confocale et la tomographie par cohérence optique requièrent normalement des objectifs de différentes ouvertures numériques. En effet, comme nous le rappelle l'équation suivante, on veut avoir une ouverture numérique élevée afin d'obtenir une résolution cellulaire en microscopie confocale:

$$\Delta r = \frac{0.4\lambda}{NA}. \quad (2.3)$$

Toutefois, en OCT, nous cherchons à avoir une faible ouverture numérique afin d'obtenir une longue distance de Rayleigh. Afin de satisfaire ces deux caractéristiques, nous choisissons de remplir la pupille de l'objectif en microscopie confocale, mais de ne pas la remplir en OCT afin d'obtenir une ouverture numérique effective plus faible, donnée par :

$$NA_{eff} = \frac{\phi_{faisceau}}{2f}. \quad (2.4)$$

On voit clairement à la Figure 2.7 la relation entre le remplissage de la pupille et l'ouverture numérique pour un objectif de microscope.

La taille du faisceau à son entrée dans le bras d'imagerie est déterminée par le choix de collimateurs reliant les deux montages au bras d'imagerie. Le contrôle de la distance de Rayleigh en OCT peut donc être fait en contrôlant la focale des collimateurs pour ce montage. Le plan focal en microscopie confocale est inclus dans la profondeur de champ plus grande de l'OCT.

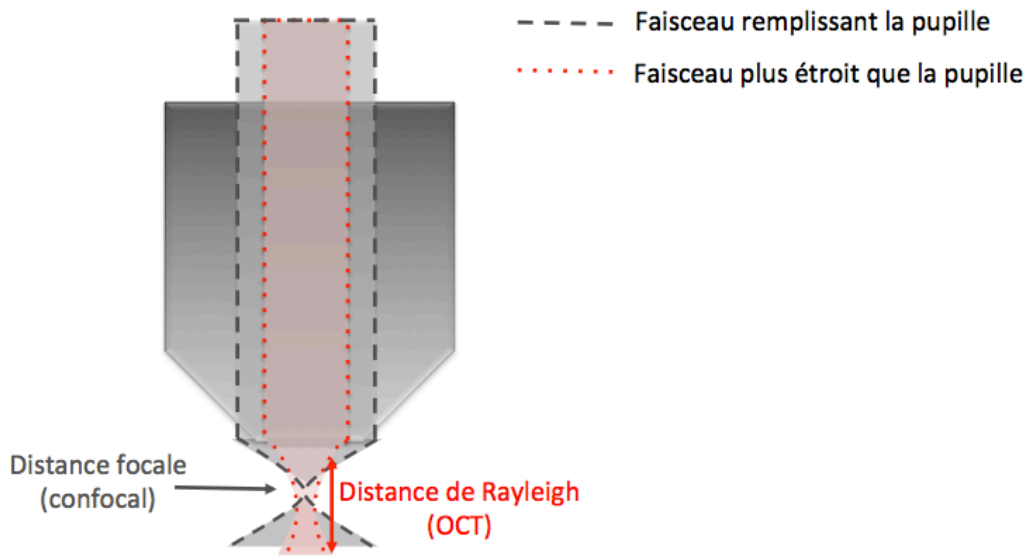


Figure 2.7 Effet du diamètre du faisceau sur l'ouverture numérique effective d'un objectif et la distance de Rayleigh.

Présentons maintenant la démarche permettant d'obtenir l'ouverture numérique et la distance de Rayleigh de l'endo-microscope en fonction des pièces choisies.

On cherche à exprimer le NA effectif de la GRIN d'imagerie en fonction la largeur du faisceau à son entrée dans la lentille achromate ( $A$ ) qui couple la lumière dans l'endoscope. La démarche pour y arriver consiste en résumé à relier le demi angle accepté par chacune des lentilles (achromate, GRIN relais et GRIN d'imagerie) à la taille du faisceau. Les différents éléments à considérer pour cette démarche sont illustrés à la Figure 2.8.

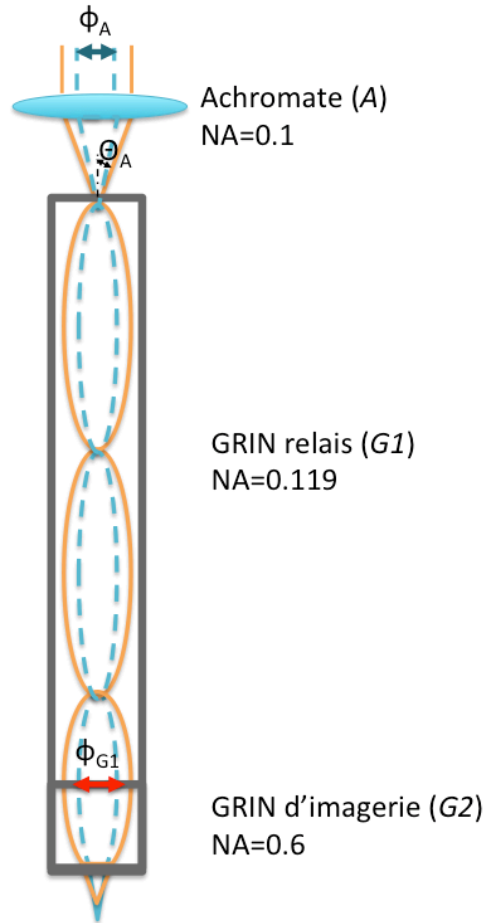


Figure 2.8 Trajet optique à travers le micro-endoscope pour des faisceaux à l'entrée de différentes tailles. Faisceau plein: remplit la pupille de l'objectif GRIN. Faisceau pointillé: ne remplit pas complètement la pupille de l'objectif GRIN.

Pour des rayons parallèles entrant dans une lentille, on peut relier la taille du faisceau incident ( $\phi_A$ ) à l'ouverture numérique effective de la lentille A ( $NA_{eff A}$ ) à l'aide de la relation suivante :

$$f_A = \frac{\phi_A}{NA_{eff A}}. \quad (2.5)$$

Cette ouverture numérique est liée à l'angle maximal qui sera transmis à la GRIN relais. Cet angle ( $\theta_A$ ) est lui-même relié à la taille du faisceau qui sera transmis à la GRIN d'imagerie selon l'équation suivante :

$$\theta_A = \sin^{-1}(NA_{eff\ A}) = \sin^{-1}\left(n_0 \frac{\phi_{G1}}{2} \sqrt{A_{relais}}\right) \quad (2.6)$$

où  $n_0$  est l'indice de réfraction au centre de la GRIN relais et  $\sqrt{A_{relais}}$  est sa constante de gradient.

On obtient finalement la taille recherchée du faisceau  $\phi_{G1}$  à son entrée dans la GRIN d'imagerie :

$$\phi_{G1} = \frac{2 \cdot NA_{eff\ A}}{n_0 \cdot \sqrt{A_{relais}}} \quad (2.7)$$

On peut finalement en déduire l'ouverture numérique effective de l'endoscope :

$$NA_{eff\ G2} = \frac{\phi_{G1}}{2 \cdot f_{G2}} \quad (2.8)$$

où la distance focale de la GRIN d'imagerie est donnée selon les fabricants par l'équation (2.9) suivante, où  $z$  est la longueur de la GRIN d'imagerie et  $g$  est une variation de la constante de gradient inversement proportionnelle à la constante de gradient  $\sqrt{A}$ :

$$f_{G2} = \frac{1}{n_0 \cdot g_{G2} \cdot \sin(g_{G2} \cdot z_{G2})}. \quad (2.9)$$

Finalement, l'ouverture numérique est reliée à la distance de Rayleigh du système OCT. En effet, à partir de l'étranglement  $w_0$ , on peut obtenir la distance de Rayleigh suivante :

$$b = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda} = \frac{2\pi}{\lambda} \left( \frac{2\lambda}{\pi \theta_{G2}} \right)^2, \quad (2.10)$$

où  $\theta_{G2} = \sin^{-1}(NA_{eff\ G2})$ .

À partir des équations du paragraphe précédent et des paramètres des pièces utilisées pour le bras d'imagerie décrits au Tableau 2.4, on peut trouver les valeurs numériques nécessaires pour déduire l'ouverture numérique et la distance de Rayleigh de l'endoscope. À l'aide de ces valeurs, on obtient un étranglement  $w_0$  de  $1.38\mu m$  et une distance de Rayleigh  $b$  de  $10\mu m$  dans le cas de la microscopie confocale pour un collimateur donnant un faisceau de  $2.76mm$  de diamètre. Pour l'OCT, il est nécessaire de faire un compromis entre la résolution et la distance de Rayleigh.

Avec une autre configuration comportant un collimateur donnant un faisceau de 1.4mm de diamètre, il est possible d'obtenir un étranglement  $\omega_0$  de 2.8 $\mu$ m et une distance de Rayleigh  $b$  de 20 $\mu$ m.

Tableau 2.4 Paramètres caractéristiques des pièces optiques utilisées pour le bras d'imagerie

Paramètre	Valeur
Taille du faisceau à l'entrée du bras d'imagerie, i.e. à la sortie des collimateurs ( $\phi_{faisceau}$ ) pour la microscopie confocale	2.76 mm
Distance focale de l'objectif ou achromate ( $f_{obj}$ )	45 mm (triplet) ou 30 mm (doublet)
Focale de la première lentille du télescope ( $f_1$ )	60 mm
Focale de la deuxième lentille du télescope ( $f_2$ )	25 mm
Indice de réfraction au centre de la GRIN de relais ( $n_{0-relais}$ ) <sup>2</sup>	1.615
Constante de gradient de la GRIN de relais ( $\sqrt{A_{relais}}$ )	0.421
Longueur de la GRIN objectif ( $z_{obj}$ )	0.72 mm
Indice de réfraction au centre de la GRIN d'imagerie ( $n_{0-obj}$ )	1.643
Constante de gradient de la GRIN d'imagerie ( $\sqrt{A_{obj}}$ )	2.196

## Acquisition

Pour utiliser les deux microscopes et ne pas limiter la capacité à acquérir des données, deux ordinateurs ont été utilisés. Il est possible d'acquérir des images simultanément avec les deux systèmes en donnant le contrôle des miroirs galvanométriques à l'interface du système OCT et en synchronisant l'acquisition de la plateforme du microscope confocal avec le balayage des miroirs galvanométriques.

---

<sup>2</sup> Les caractéristiques des GRIN sont données à 550nm par le fabricant Go!Foton

## 2.5 Montage expérimental

Physiquement, les deux modalités d'imagerie sont combinées dans le bras d'imagerie tel que décrit plus tôt dont la position axiale (en  $z$ ) peut être ajustée par rapport à l'endoscope à l'aide d'une monture de translation. Le bras peut être déplacé latéralement (en  $x$  et  $y$ ) à l'aide de platines de translations. Il pourrait aussi être fixé au stage stéréotaxique.

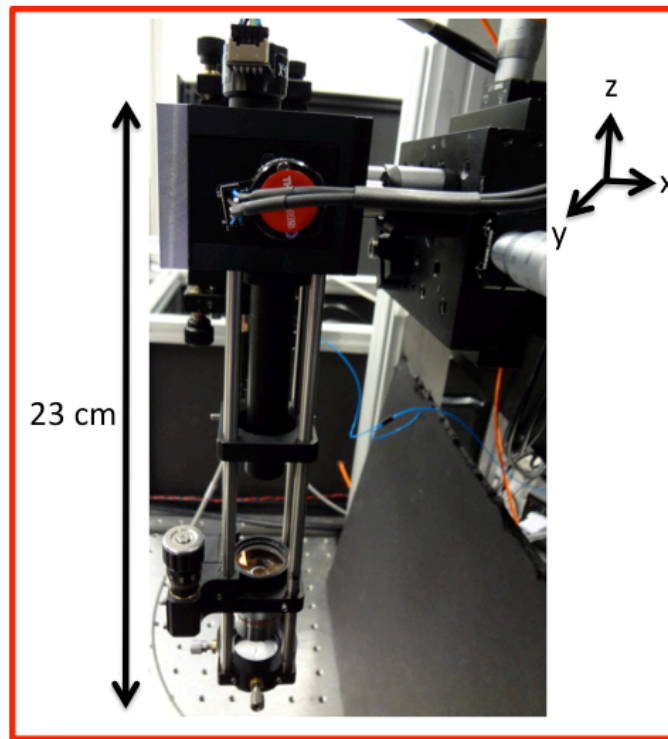


Figure 2.9 Bras d'imagerie du système commun

Pour tenir la GRIN en place, on l'insère dans une pièce fabriquée sur mesure (Figure 2.10) puis on la fixe à l'aide d'une vis de nylon pour éviter d'endommager la lentille. La pièce de support est insérée dans une monture de translation en  $x$  et  $y$  permettant d'optimiser l'alignement de l'objectif de microscope (ou achromate) avec l'endoscope. On peut contrôler la distance de travail en déplaçant l'objectif par rapport à la GRIN à l'aide d'une monture de translation en  $z$ .

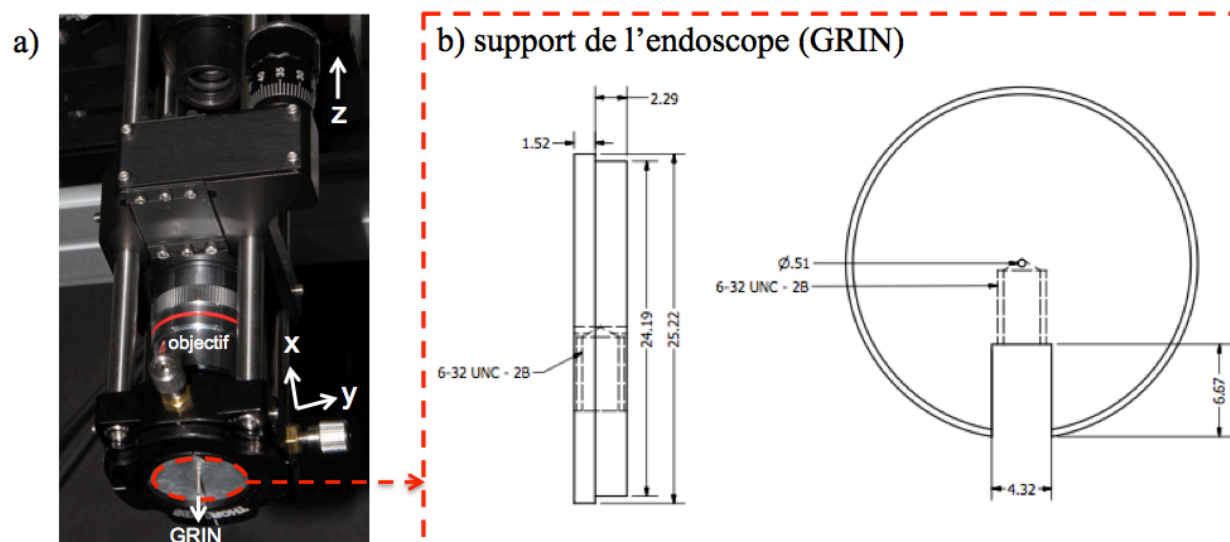


Figure 2.10 Positionnement de l'endoscope. a) support à extrémité du bras d'imagerie b) vue schématique de côté et de face du support de l'endoscope (unités : mm). L'endoscope est tenu en place à l'aide d'une vis de pression munie d'un bout en nylon.

Les expérimentations seront réalisées sur des souris à l'Institut de Cardiologie de Montréal, selon le protocole d'expérimentation sur les animaux FCDA4-2766. L'endoscope permettra d'imager le cortex sur des souris saines, puis de corréler une crise épileptique avec le flux sanguin et les traces de calcium (Tsytarev, Rao, Maslov, Li, & Wang, 2013; Vincent et al., 2006).

Pour permettre l'insertion de l'endoscope dans le cerveau de la souris, une craniotomie est exécutée. Les souris sont anesthésiées, et leur cerveau est recouvert d'agarose. L'induction d'une crise épileptique peut être faite en injectant de la bicuculine. On peut aussi visualiser clairement les vaisseaux sanguins en injectant du FITC.

Le bras d'imagerie est positionné au-dessus du plateau stéréotaxique. Le bras est fixé sur des platines de translation qui permettent de se placer au-dessus du plateau.

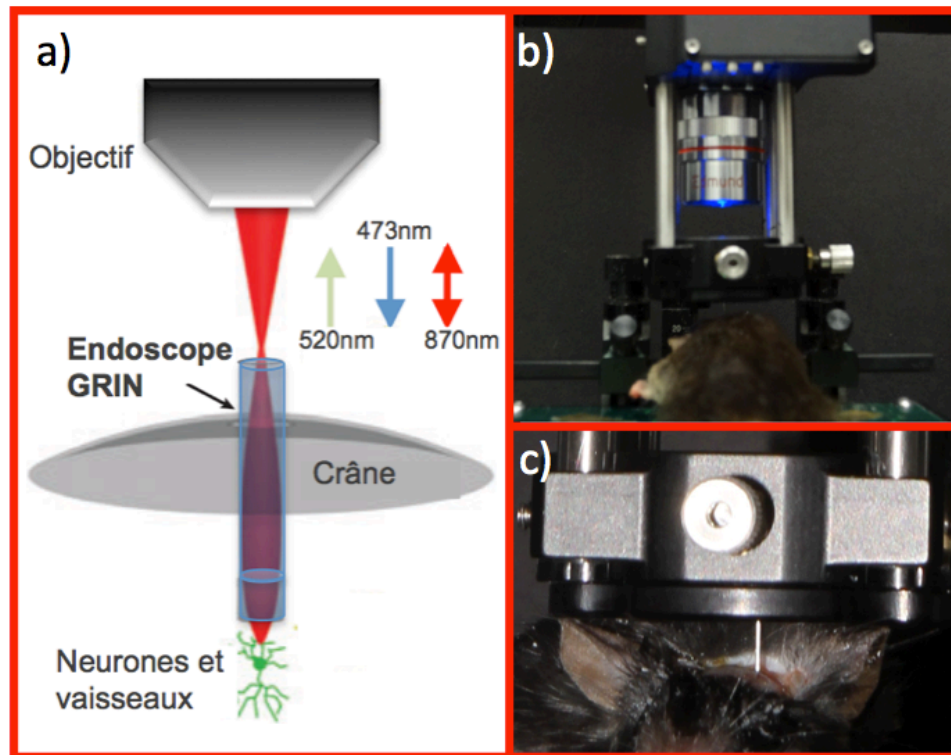


Figure 2.11 Montage expérimental. a) rappel du montage schématique. b) objectif de microscope suivi de la monture de translation X-Y puis de la GRIN et de la souris tenue en place à l'aide d'un stage séréotaxique et de barres d'oreilles. La souris est positionnée sur une plaque chauffante. c) plan rapproché de l'insertion de la GRIN dans le cerveau à travers une fenêtre de craniotomie.



## CHAPITRE 3 RÉSULTATS ET DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous présenterons et discuterons les différentes étapes de validation du système ainsi que les résultats obtenus avec les différentes modalités. D'abord, le microscope confocal sera caractérisé à l'aide de cibles de résolution et de microbilles fluorescentes. Des résultats *in vivo* sur des souris seront également exposés. Le système d'OCT Doppler (DOCT) sera ensuite validé à l'aide de fantômes et d'un suivi hémodynamique *in vivo* sur des souris. Nous présenterons enfin les résultats *ex vivo* et *in vivo* obtenus à l'aide des deux systèmes combinés à travers l'endoscope. Ce chapitre se conclura par quelques suggestions pour améliorer l'endoscope.

### 3.1 Microscope confocal en fluorescence

Dans cette section, nous caractériserons le microscope confocal en fluorescence sans l'endoscope. Nous le caractériserons d'abord *ex vivo*, puis discuterons des résultats *in vivo*.

#### 3.1.1 Caractérisation *ex vivo*

Le montage de microscopie confocale réalisé a été utilisé en réflectance pour imager une cible de résolution négative (USAF1951, Thorlabs), tel qu'illustré à la Figure 3.1. On peut voir clairement les plus petites barres de la cible, soient ceux du groupe 7, élément 6. On peut donc conclure que la limite de résolution est inférieure à  $2,19\mu\text{m}$ .

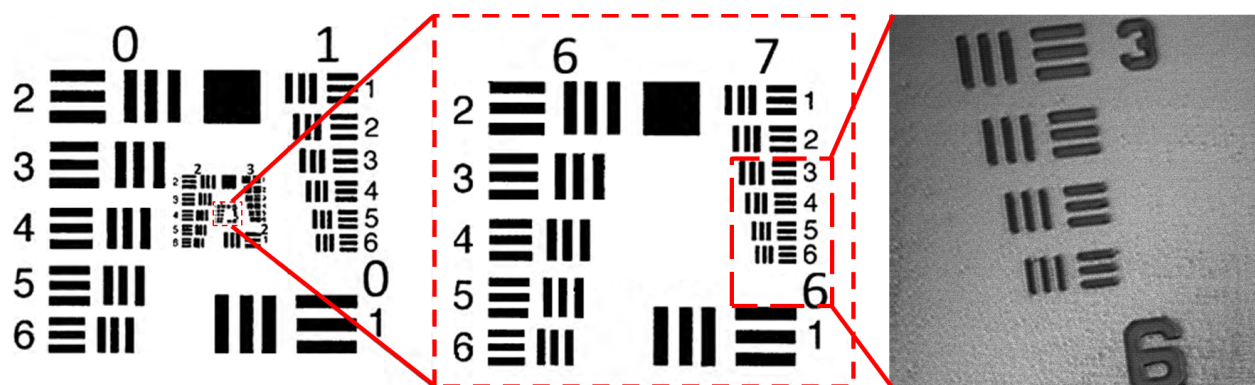


Figure 3.1 : Groupe 7, élément 6 d'une cible de résolution négative USAF 1951 imagée en réflectance avec le microscope confocal (sans la partie endoscopique assurée par le relai GRIN)

On peut évaluer plus exactement la résolution latérale en utilisant les barres de la cible de résolution pour mesurer la fonction d'étalement du bord (*edge spread function*) du microscope confocal. Pour ce faire, on réalise simplement un profil de l'intensité sur une ligne perpendiculaire à une barre de la cible. Un exemple typique de profil est illustré à la Figure 3.2 a). La résolution latérale mesurée est de  $0,7\ \mu\text{m}$ . Ce résultat est très proche de la valeur de  $0,5\ \mu\text{m}$  prévue par la théorie.

La résolution axiale a quant à elle été évaluée en déplaçant axialement l'objectif par rapport à une microbille de  $1\ \mu\text{m}$  de diamètre. L'intensité moyenne du groupe de pixels formant la bille est mesurée pour chaque position axiale. On peut alors calculer la résolution axiale en déterminant la largeur à mi-hauteur (*FWHM*) de la courbe obtenue, tel que présenté à la Figure 3.2 b).

La différence entre les valeurs théoriques et expérimentales pour les résolutions axiale et latérale peut être expliquée par différentes aberrations ou déviations de l'approximation paraxiale.

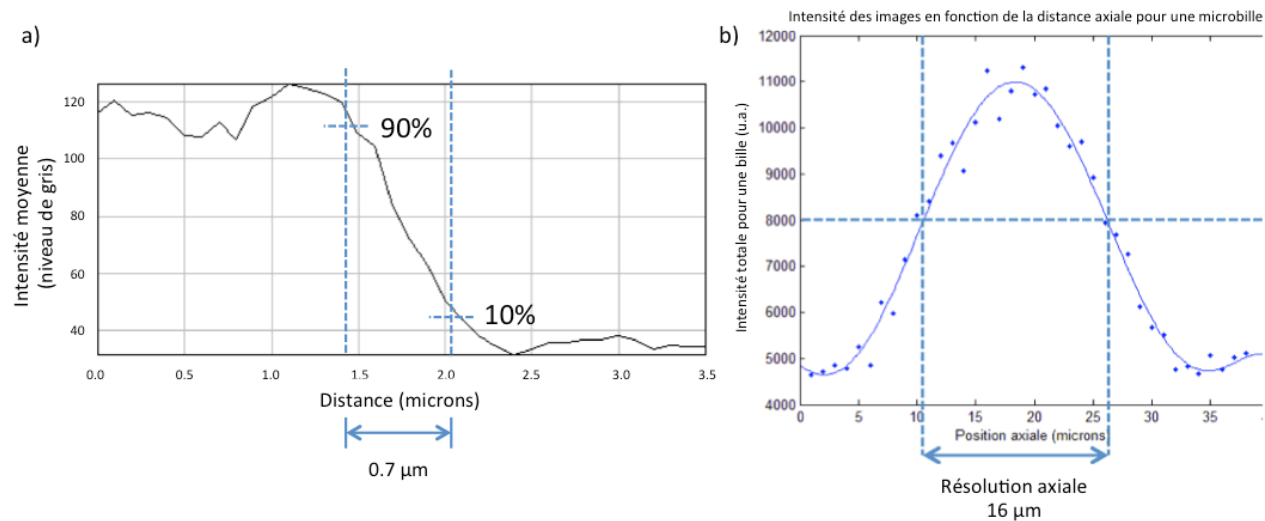


Figure 3.2 : a) résolution latérale b) résolution axiale pour le montage avec fibre de détection de cœur de  $50\ \mu\text{m}$  (régression polynomiale)

Une fois la résolution du système de microscopie confocale caractérisée en réflectance, nous avons imagé des microbilles fluorescentes de  $1\ \mu\text{m}$  de diamètre. On peut remarquer à la Figure 3.3 qu'il est possible de discerner des microbilles individuelles.

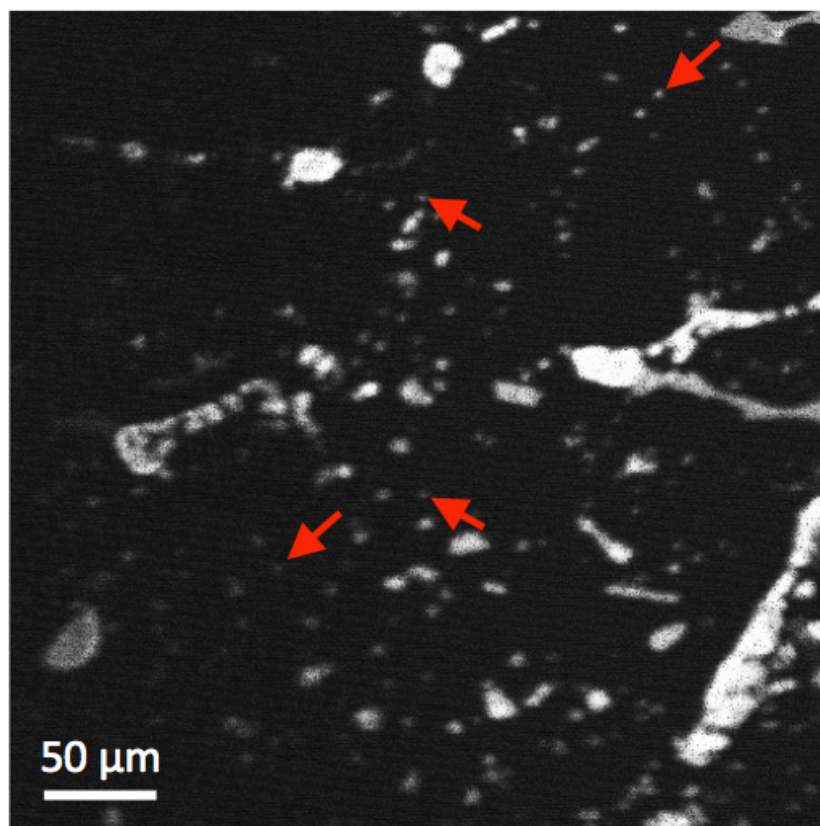


Figure 3.3 : microbilles de 1  $\mu\text{m}$  imagées en fluorescence avec le microscope confocal sans l'endoscope GRIN.  
Les flèches pointent sur quelques microbilles individuelles.

### 3.1.2 Résultats *in vivo*

Le microscope confocal en fluorescence a été utilisé pour imager le cerveau de souris. Il est très intéressant de pouvoir utiliser le montage pour imager le cerveau à travers une fenêtre de craniotomie sans l'endoscope, puisqu'il est possible d'imager ainsi l'activité neuronale en surface avec un plus grand champ de vue que si un endoscope était utilisé. De plus, le fait de s'affranchir de l'endoscope fait en sorte que l'imagerie est sujette à moins d'aberrations et de rétro réflexions.

L'imagerie a été réalisée à travers une lamelle de microscope et une fenêtre de craniotomie. Un agent de contraste, le FITC-Dextran (300  $\mu\text{L}$ , 5% w/v) a été injecté à la souris au préalable afin de permettre de bien discerner les vaisseaux sanguins. On peut constater à la Figure 3.4 que le système permet de visualiser des vaisseaux sanguins de taille comparable à des neurones (quelques microns). Sur cette figure, les points de plus grande intensité représentent la jonction entre plusieurs vaisseaux (flèches).

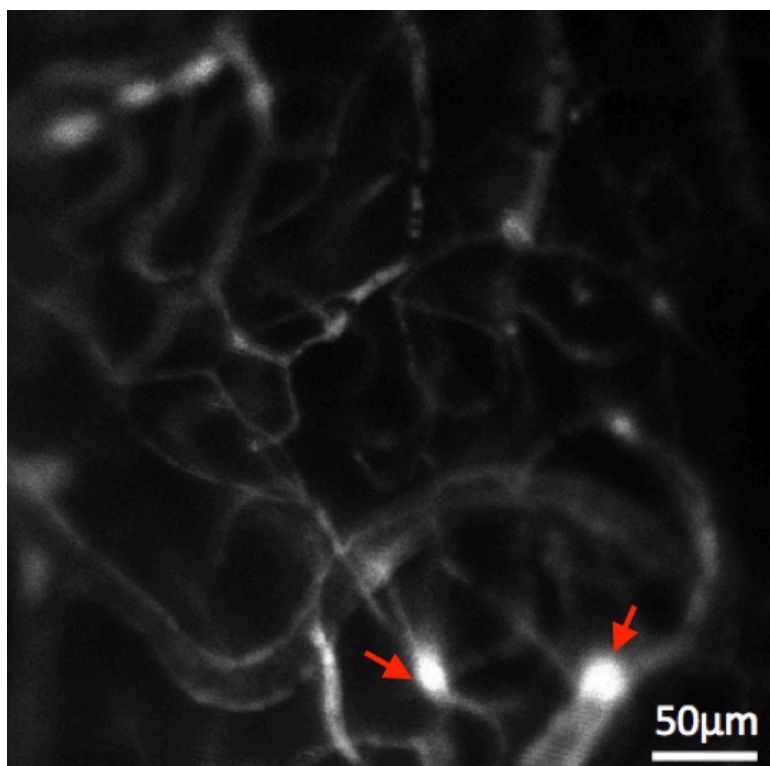


Figure 3.4: Vaisseaux sanguins du cerveau de souris post mortem, dans lesquels du FITC a été injecté, imagés à travers une fenêtre de craniotomie avec le microscope confocal (sans la GRIN). Les flèches pointent vers la jonction entre plusieurs vaisseaux.

## 3.2 DOCT

Le système de DOCT sans l'endoscope a été validé auparavant (Baraghis et al., 2011). Le même montage a été légèrement modifié pour y inclure le bras d'imagerie conçu pour intégrer le système DOCT au microscope confocal et à l'endoscope. Nous résumerons ici les expériences ayant été conduites par (Baraghis et al., 2011) pour valider et caractériser le système DOCT.

### 3.2.1 Résultats *ex vivo* en DOCT

La validation *ex vivo* du système DOCT a été réalisée à l'aide d'un fantôme composé de tubes de différents diamètres remplis d'intralipide et positionnés dans un moule de propriétés semblables à celles des tissus. Un flux précis est imposé dans ces tubes à l'aide d'un pousse-seringue automatisé. Des exemples typiques d'images obtenues sont présentés à la Figure 3.5.

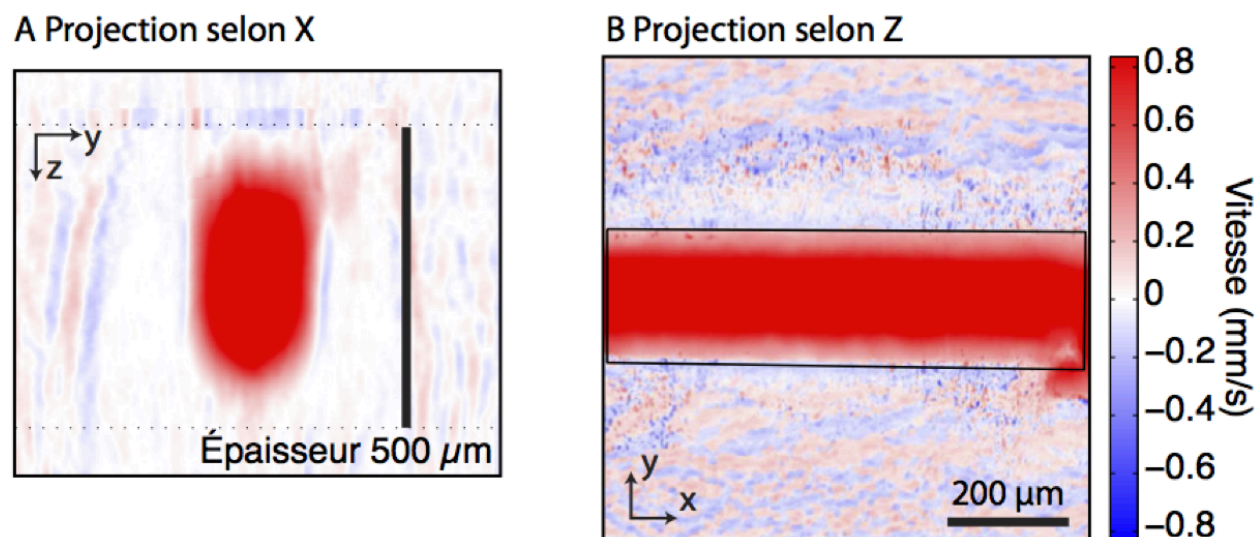


Figure 3.5 Validation du DOCT par l'imposition d'un flux dans un tube rempli d'intralipide A. Coupe transversale du tube (projection selon l'axe X), le fantôme de 200 µm de diamètre est incliné vers le bas et couvre une épaisseur de 500 µm. B. Vue de haut, c'est à travers la région sélectionnée que le flux est calculé. La couleur indique la vitesse. (tiré de Baraghis et al., 2011)

Les vitesses calculées pour les différents flux imposés dans le fantôme sont présentées au Tableau 3.1. On y remarque que l'erreur est plus importante pour des flux plus lents ou plus rapide. Pour les flux plus lents, cela est dû au filtre passe haut utilisé qui cause un décalage des fréquences Doppler. Pour les plus hautes fréquences, l'erreur est due au repliement des fréquences. Les données du Tableau 3.1 sont utilisées afin de corriger ces erreurs lors des expériences.

Tableau 3.1 Précision de la mesure de flux dans un capillaire (Baraghis et al., 2011)

Flux imposé (nL/s)	Flux mesuré (nL/s)	Erreur (%)
8.3	11.6	39
16.7	20.8	25
33.3	31.5	-5
50	48.1	-4
66.7	57.7	-13
83.3	74.7	-10
100	83.3	-16
166.7	116.9	-30

Sur le fantôme, la profondeur de pénétration a été évaluée à environ 1000µm. La sensibilité du système, qui correspond à l'intensité minimale pouvant être détectée, est quant à elle de 106 dB pour un temps d'acquisition de 65µs de la caméra. La gamme dynamique est de 76 dB.

### 3.2.2 Résultats *in vivo* en DOCT

Le système de DOCT sans endoscope a également été validé *in vivo* sur des souris pour réaliser un suivi hémodynamique, tel qu'exposé à la Figure 3.6 (Baraghis et al., 2011).

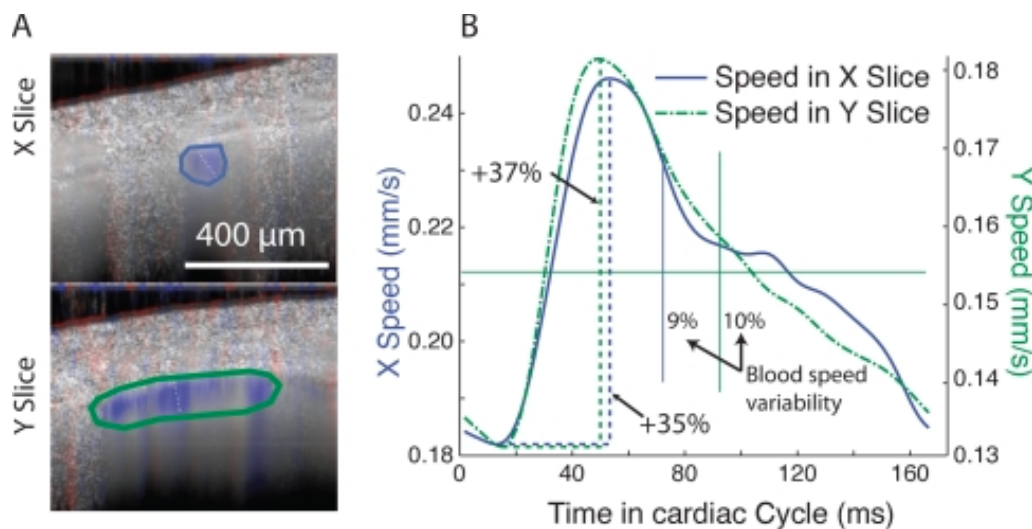


Figure 3.6 Calcul du débit pulsatile dans une artère individuelle sur une souris de contrôle Figure tirée de (tiré de Baraghis et al., 2011)

## 3.3 Système multimodal avec l'endo-microscope

### 3.3.1 Résultats en microscopie confocale avec l'endoscope

À l'aide de l'endoscope, nous avons d'abord réalisé des images réflectance sur une cible de résolution avec le microscope confocal, tel qu'illustré à la Figure 3.7. Il est important de noter que seulement 1% du signal est utilisé pour réaliser des images en réflectance avec l'endoscope, en raison du miroir dichroïque qui dirige principalement le signal en fluorescence vers le détecteur.

En utilisant la même démarche que pour le microscope confocal sans l'endoscope, nous avons pu déterminer la résolution latérale, qui est de 3µm. La résolution est un légèrement dégradée par rapport au système sans l'endoscope en raison des aberrations spatiales causées par ce dernier. Cela est attribuable en partie à la déviation de la lumière de l'approximation paraxiale sur tout le chemin optique. On remarque également à la Figure 3.7 que l'intensité diminue vers les bords de l'image. Cela est dû au fait que le cône d'acceptance rapetisse en s'éloignant de l'axe optique.



Finalement, notons que la longueur de la GRIN utilisée pour réaliser les figures suivantes a été ajustée à l'aide d'un polissage manuel qui pourrait induire d'autres aberrations.

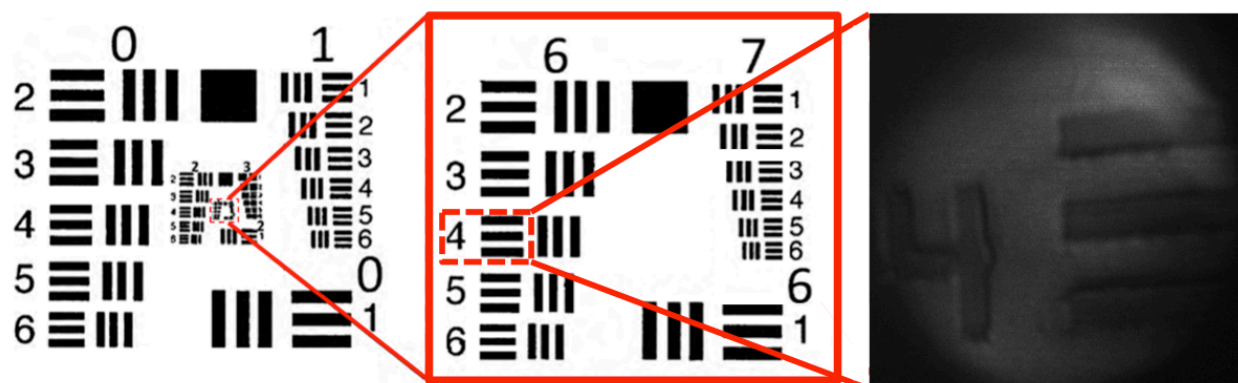


Figure 3.7 : Cible de résolution négative USAF 1951 imagée en réflectance avec l'endo-microscope GRIN en mode confocal.

Malgré les aberrations, on arrive à distinguer des structures de quelques microns. Nous avons effectivement réalisé des images de microbilles fluorescentes (Figure 3.8) à l'aide du système confocal et de l'endo-microscope. La résolution est donc suffisante pour imager des neurones *in vivo*. Il serait possible de corriger optiquement les aberrations si nécessaire (Lee & Yun, 2011).

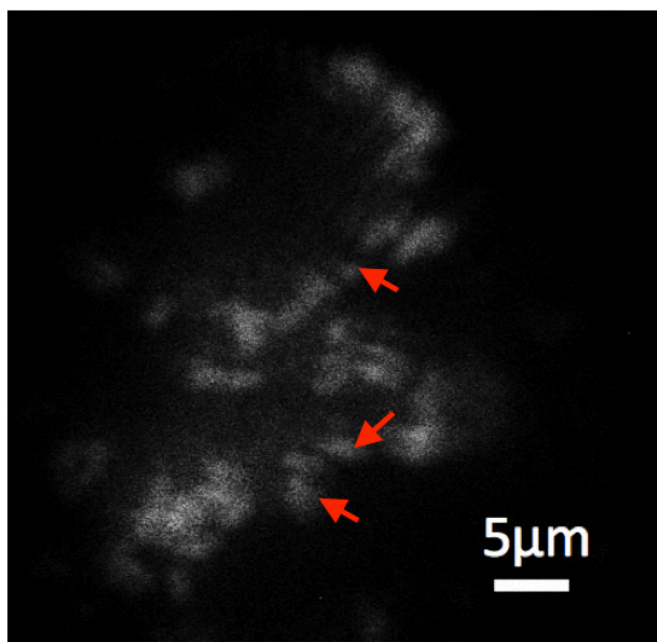


Figure 3.8 : microbilles de 1μm imagées en fluorescence avec l'endo-microscope GRIN en mode confocal. Les flèches rouges pointent vers des microbilles individuelles.

Le champ de vue peut être évalué de deux façons. La première est d'utiliser les lignes d'une cible de résolution dont on connaît la taille. La seconde est de déplacer un objet d'un bout à l'autre du champ de vue en mesurant son déplacement à l'aide d'une vis micrométrique graduée. On obtient dans les deux cas un champ de vue d'environ  $85\mu\text{m}$ , ce qui est compatible avec la valeur théorique ( $90\mu\text{m}$ ).

Finalement, nous avons réalisé des tests *in vivo* en microscopie confocale en injectant du FITC chez des souris. Nous avons inséré l'endo-microscope dans le cerveau de souris à travers une fenêtre de craniotomie. Nous pouvons ainsi voir à la Figure 3.9 un vaisseau sanguin. Nous discuterons à la section suivante d'améliorations possibles au système pour l'imagerie *in vivo*.

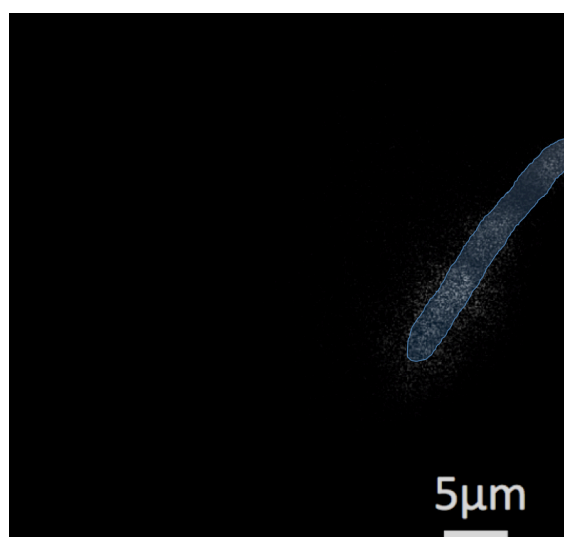


Figure 3.9 Vaisseaux sanguins du cerveau de souris post mortem, auquel du FITC a été injecté, imagés à travers une fenêtre de craniotomie avec l'endo-microscope GRIN en mode confocal

### 3.3.2 Résultats en OCT avec l'endoscope

Pour valider le système DOCT avec l'endo-microscope, nous avons utilisé des tubes remplis d'intralipide dans lesquels nous avons imposé des flux retrouvés physiologiquement dans le cerveau de souris. Nous pouvons constater à la Figure 3.10 que notre système permet bel et bien de discerner de tels flux. À noter que pour cette figure, le tube est légèrement incliné.



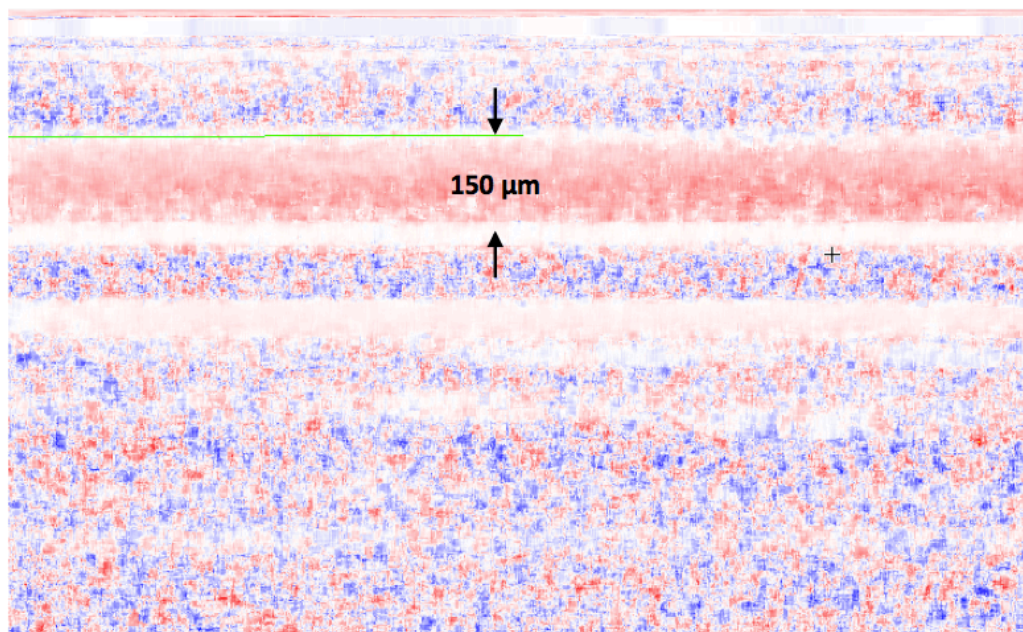


Figure 3.10 : tube de 150  $\mu\text{m}$  de diamètre rempli d'intralipide imagé avec le système Doppler OCT. Ici, un flux de 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  est imposé

## CHAPITRE 4 DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous discuterons des différents résultats obtenus ainsi que des améliorations possibles du système. Nous débuterons en discutant de la microscopie confocale, pour ensuite passer à l'OCT Doppler puis à l'endoscopie. Nous terminerons ce chapitre par des suggestions d'ajouts qui permettraient de rajouter de la flexibilité au système.

### 4.1 Microscopie confocale en réflectance et en fluorescence

Les résultats obtenus en microscopie confocale sont conformes à la théorie lorsqu'il s'agit d'imager des cibles de résolution ou bien des microbilles. L'imagerie d'échantillons biologiques pose davantage de difficultés.

On constate à la Figure 3.9 que les images obtenues *post mortem* ne permettent pas de distinguer aisément les structures physiologiques. On émet l'hypothèse que ce manque de contraste est dû au fait que l'insertion de l'endoscope cause la rupture de certains vaisseaux sanguins. L'agent de contraste FITC présent dans le sang est alors répandu et cause la fluorescence des tissus environnants.

D'autre part, l'intensité du signal détecté pourrait être affectée par le photoblanchiment, qui est plus probable pour de longs temps d'imagerie. Notons que dans le cas d'imagerie *in vivo*, le flux sanguin résulte en un rafraichissement du fluorophore qui permet d'éviter le photoblanchiment. De plus, le laser utilisé (473 nm) ne permet d'obtenir que 50 % du signal maximal pouvant être émis *in vivo* par l'Oregon Bapta-1 Green, un marqueur du calcium utilisé pour visualiser l'activité neuronale. En effet, tel qu'illustré à la Figure 4.1, un laser centré au maximum d'absorption de ce fluorophore (488 nm) serait préférable pour obtenir un maximum d'émission du fluorophore.

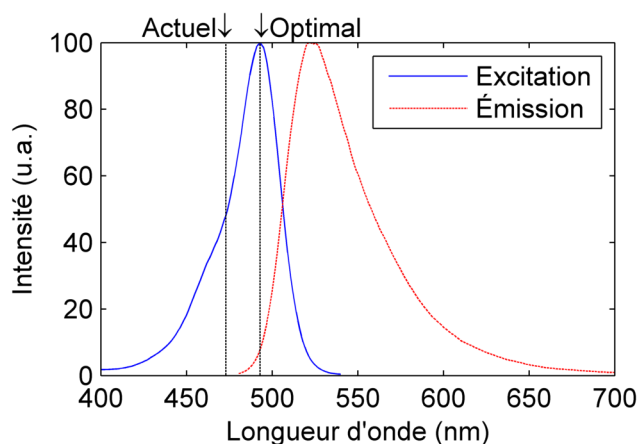


Figure 4.1 : Spectre d'excitation et d'émission du fluorophore Oregon Bapta-1 Green

## 4.2 OCT Doppler

Les résultats en DOCT peuvent être affectés par quelques paramètres que nous discuterons ici.

Le principal inconvénient du système actuel est lié au mouvement de l'animal lors de l'imagerie *in vivo*. En effet, le mouvement dû à la respiration et au rythme cardiaque de l'animal font en sorte qu'il est très difficile de distinguer le flux sanguin des signaux physiologiques. Cela est sans compter que les réflexes de l'animal peuvent être assez importants pour causer un déplacement de l'endoscope par rapport aux autres pièces du bras d'imagerie, ce qui affecte alors significativement la qualité des images. Ce dernier inconvénient pourrait être amoindri par le design sur mesure d'une pièce permettant de fixer de manière plus rigide l'ensemble des pièces du bras d'imagerie avec l'endoscope. Une dernière limitation connue dans ce projet est simplement la difficulté de maintenir l'animal en vie après la craniotomie. Les animaux imagés étaient réutilisés d'autres expériences et étaient donc déjà affaiblis. Il est évidemment impossible d'obtenir des images Doppler *post mortem*.

Une autre limitation est due au fait qu'il n'y a pas de revêtements anti réflexion disponibles pour deux longueurs d'ondes aussi différentes que 473 nm et 870 nm. Ainsi, il y a des rétro réflexions non négligeables à l'intérieur de l'endoscope. Cela a pour effet de générer de l'auto-interférence dans les images structurales d'OCT. Une manière de réduire ces réflexions serait d'utiliser un endoscope poli à  $8^\circ$ . Les réflexions parasites seraient ainsi redirigées hors du système d'imagerie.

Il est également à noter que la compensation de la dispersion pour l'OCT a été réalisée à l'aide de prismes de verre. Toutefois, l'indice de réfraction de ces prismes n'est pas le même que celui de l'endoscope. Dans le futur, il faudrait idéalement trouver du verre du même indice.

### 4.3 Différence entre le microscope avec et sans GRIN

Une des difficultés liées à la caractérisation de l'endoscope est sa faible distance de travail. Cette dernière est si courte ( $<50\text{ }\mu\text{m}$ ) qu'il est difficile de déplacer la GRIN par rapport à l'échantillon (cible de résolution, miroir, etc.) sans le toucher. Le fait de travailler aussi proche de l'échantillon augmente aussi les risques de briser l'endoscope. Il est donc recommandé de travailler avec une GRIN qui comporte un revêtement de métal sur toute sa longueur lorsque cela est possible.

Il est important de noter que puisque le système est fibré et comporte un miroir dichroïque, seulement 1% de la lumière revient au détecteur lorsque l'on image en réflectance. Il est donc normal que le rapport signal sur bruit en microscopie confocale soit moins bon à la Figure 3.7 que pour le système sans dichroïque utilisé pour la première validation du système. En plus des pertes encourues au miroir dichroïque, le système avec l'endo-microscope subit des pertes dues aux rétro réflexions au niveau des faces de la GRIN. Il serait possible de significativement réduire les réflexions en ajoutant des revêtements sur mesure à la GRIN.

### 4.4 Amélioration de l'endoscope

Pour les expériences *in vivo*, le fait de devoir insérer l'endoscope à travers la fenêtre de craniotomie fait en sorte qu'il n'est pas possible de recouvrir le cerveau d'une lamelle. Cela a pour conséquence d'augmenter les chances de problèmes de surpression dans le cerveau. Lorsqu'un tel problème survient, il devient impossible de visualiser les vaisseaux sanguins. Il serait donc intéressant de minimiser la taille de la fenêtre de craniotomie.

Une autre difficulté est liée au mouvement de la GRIN lors de son insertion dans les tissus. D'une part, étant donné la petite taille de la GRIN et son ouverture numérique limitée, l'alignement de celle-ci est critique. Le moindre déplacement par rapport au reste du bras d'imagerie peut donc affecter significativement la qualité des images. D'autre part, les contraintes mécaniques exercées sur l'endoscope par les tissus peuvent l'endommager sévèrement ou le rompre. Il serait possible d'ajouter un revêtement de métal sur toute la longueur de l'endoscope pour améliorer sa rigidité.

Le diamètre plus grand augmenterait toutefois les dommages aux tissus. On pourrait aussi réduire au maximum la longueur de l'endoscope.

Un des désavantages du design présenté est son petit champ de vue. Pour l'améliorer, un micro prisme avec un revêtement réflecteur sur son hypoténuse pourrait simplement être rajouté à la fin de l'endoscope, tel qu'illustré à la Figure 4.2. Pour ce faire, il faudrait utiliser une GRIN objectif plus courte afin de compenser le chemin optique parcouru dans le prisme. Il est à noter que cette solution entrainera une diminution de l'ouverture numérique. Ce design, combiné avec une pièce permettant la rotation de l'endoscope, donnerait un meilleur champ de vue par l'assemblage numérique des images obtenues tout au long de la rotation. On peut voir l'implémentation d'un tel système dans l'article de (J. K. Kim, Choi, & Yun, 2013). On s'attend aussi à ce que l'ajout d'un prisme réduise les dommages causés aux tissus grâce à sa coupe oblique qui facilite la pénétration dans les tissus. Il est important de noter que la distance de travail sera plus longue avec le prisme. Cela aura pour effet de diminuer le signal collecté en raison de l'absorption et de la diffusion dans les tissus.

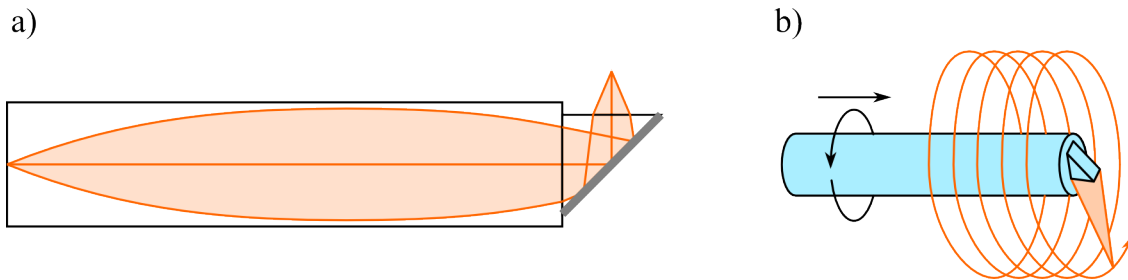


Figure 4.2 endoscope GRIN terminé par un micro prisme dont l'hypoténuse comporte un revêtement réfléchissant. a) propagation du faisceau à travers l'endoscope et le micro prisme. b) en déplaçant et en pivotant l'endoscope, un champ de vue plus large peut être reconstruit à partir de sa trajectoire hélicoïdale.

## 4.5 Amélioration de la flexibilité du bras d'imagerie

Réduire la taille du bras d'imagerie le rendrait plus adapté au contexte d'imagerie *in vivo*. Il serait possible d'y parvenir en remplaçant le dichroïque qui sépare les longueurs d'onde des deux modalités par un multiplexeur de longueur d'onde fibré. Le coupleur nécessaire pour ce système pourrait être fabriqué sur mesure, par exemple au Laboratoire des Fibres Optiques à Polytechnique Montréal. L'insertion de ce coupleur dans le montage est illustrée à la Figure 4.3.

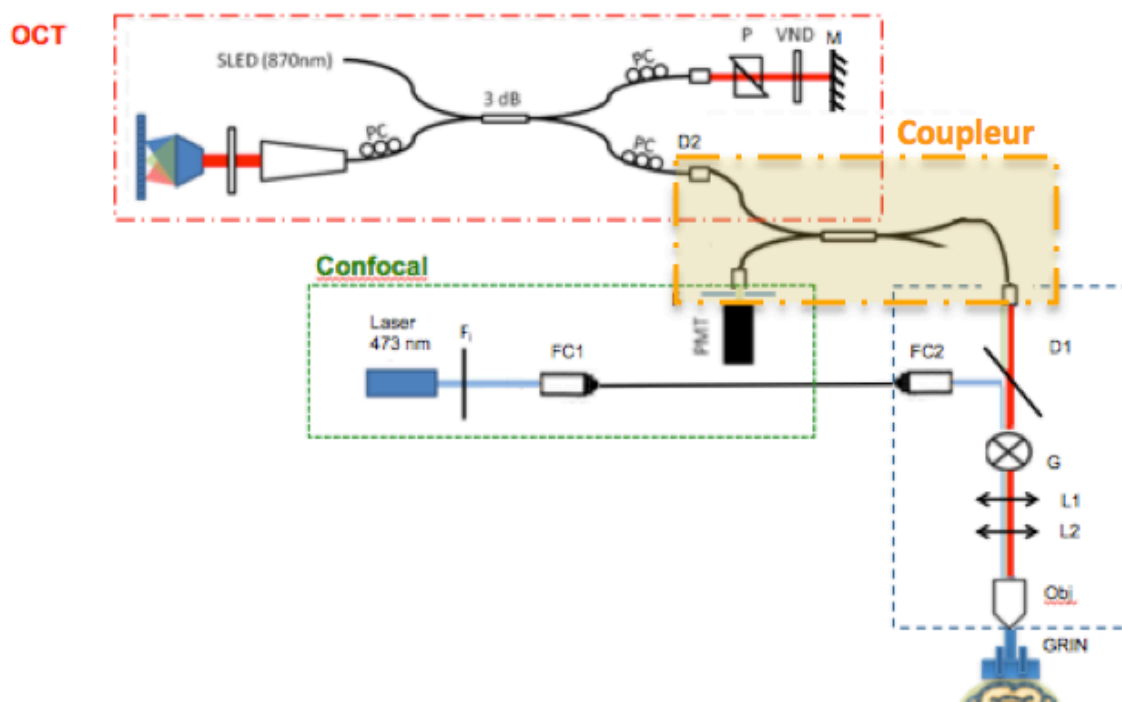


Figure 4.3 : remplacement du filtre dichroïque séparant le signal de fluorescence du signal d'OCT par un coupleur

## 4.6 Imagerie confocale multiplexée en longueur d'onde

Il serait possible de distinguer différents types d'interneurones en les marquant avec des agents de contraste différents. Le système confocal serait alors modifié en y ajoutant un second laser opérant à la longueur d'onde d'excitation du nouveau marqueur. Au retour du signal, les deux signaux de fluorescence seraient démultiplexés à l'aide de filtres spécifiques. Par exemple, il serait possible d'utiliser le marqueur Td-Tomato en plus de l'Oregon Green en rajoutant un laser à 550 nm au montage.

## CHAPITRE 5 CONCLUSION

Ce projet de maîtrise avait pour objectif de concevoir un outil permettant d'imager à haute résolution l'activité neuronale et hémodynamique du cerveau de petits animaux. Dans cette optique, ce mémoire a présenté le premier design optimisé pour combiner les modalités de microscopie confocale en fluorescence et d'OCT Doppler dans un même endo-microscope composé de lentilles à gradient d'indice.

### 5.1 Synthèse des travaux

Nous avons conçu un microscope confocal en fluorescence et modifié un système d'OCT Doppler existant. Ces deux systèmes ont été caractérisés indépendamment *ex vivo* sur des fantômes et *in vivo* sur des souris. Les deux systèmes permettent de visualiser des vaisseaux sanguins.

Un microendoscope a été conçu sur mesure pour permettre d'imager plus en profondeur dans le cerveau de manière minimalement invasive. Il est possible d'utiliser les deux microscopes avec l'endoscope à l'aide d'un bras d'imagerie flexible conçu spécialement pour imager avec les deux modalités.

Des images en microscopie confocale et en OCT ont également été réalisées *in vivo* et *ex vivo* à l'aide de l'endoscope. L'endoscope a bien permis d'obtenir la résolution nécessaire pour visualiser des neurones en microscopie confocale. Des flux ont également pu être observés en DOCT sur des fantômes.

Nous avons également mis en évidence les défis associés à l'utilisation d'un endoscope à base de lentilles à gradient d'indice pour l'imagerie *in vivo* du cortex à plusieurs longueurs d'onde.

### 5.2 Travaux futurs

Un outil permettant d'imager à la fois l'activité hémodynamique et neuronale à haute résolution facilitera certainement la compréhension des mécanismes régissant le couplage neurovasculaire. Puisque ce couplage est critique pour le bon fonctionnement du cerveau, sa compréhension pourrait mener au développement de traitements pour des pathologies telles que l'épilepsie et l'Alzheimer (Girouard & Iadecola, 2006).

En vue d'élucider les mécanismes du couplage neurovasculaire, il serait intéressant d'utiliser le système présenté pour réaliser des études longitudinales en laissant l'endo-microscope dans le cerveau de l'animal, fixé à l'aide de ciment dentaire. Au delà de la recherche fondamentale, il serait également profitable d'utiliser cet outil comme guide en neurochirurgie. Le médecin posséderait alors un outil de petite taille permettant d'obtenir à la fois des informations à haute résolution sur la structure, l'activité neuronale et hémodynamique.



## BIBLIOGRAPHIE

- Attwell, D., Buchan, A. M., Charpak, S., Lauritzen, M., MacVicar, B. A., & Newman, E. A. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321), 232–243. doi:10.1038/nature09613
- Baraghis, E. (2011, August). *Développement d'un système de tomographie par cohérence optique pour la mesure de la compliance vasculaire cérébrale in-vivo* (masters). École Polytechnique de Montréal. Retrieved from <http://publications.polymtl.ca/644/>
- Baraghis, E., Bolduc, V., Gillis, M.-A., Srinivasan, V. J., Thorin, É., Boudoux, C., & Lesage, F. (2011). Synthetic reconstruction of dynamic blood flow in cortical arteries using optical coherence tomography for the evaluation of vessel compliance. In N. Kollias, B. Choi, H. Zeng, H. W. Kang, B. E. Knudsen, B. J. Wong, ... E. D. Jansen (Eds.), (p. 78834A–78834A–10). doi:10.1117/12.875659
- Barretto, R. P. J., Ko, T. H., Jung, J. C., Wang, T. J., Capps, G., Waters, A. C., ... Schnitzer, M. J. (2011). Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy. *Nature Medicine*, 17(2), 223–228. doi:10.1038/nm.2292
- Baulac, S., Huberfeld, G., Gourfinkel-An, I., Mitropoulou, G., Beranger, A., Prud'homme, J.-F., ... LeGuern, E. (2001). First genetic evidence of GABAA receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the  $\gamma 2$ -subunit gene. *Nature Genetics*, 28(1), 46–48. doi:10.1038/ng0501-46
- Bolduc, V., Drouin, A., Gillis, M.-A., Duquette, N., Thorin-Trescases, N., Frayne-Robillard, I., ... Thorin, E. (2011). Heart rate-associated mechanical stress impairs carotid but not

- cerebral artery compliance in dyslipidemic atherosclerotic mice. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 301(5), H2081–H2092. doi:10.1152/ajpheart.00706.2011
- Boudoux, C. (2007). *Wavelength swept spectrally encoded confocal microscopy for biological and clinical applications*. Massachusetts Institute of Technology. Retrieved from <http://dspace.mit.edu/handle/1721.1/38595>
- Bouma, B. (2001). *Handbook of Optical Coherence Tomography*. Taylor & Francis.
- Bradu, A., Ma, L., Bloor, J. W., & Podoleanu, A. (2009). Dual optical coherence tomography/fluorescence microscopy for monitoring of *Drosophila melanogaster* larval heart. *Journal of Biophotonics*, 2(6-7), 380–388. doi:10.1002/jbio.200910021
- Castro Lima, V., nica, Rodrigues, E. B., Nunes, R. P., Sallum, J. F., Farah, M. E., & Meyer, C. H. (2011). Simultaneous Confocal Scanning Laser Ophthalmoscopy Combined with High-Resolution Spectral-Domain Optical Coherence Tomography: A Review. *Journal of Ophthalmology*, 2011, e743670. doi:10.1155/2011/743670
- Chen, Y., Aguirre, A. D., Ruvinskaya, L., Devor, A., Boas, D. A., & Fujimoto, J. G. (2009). Optical coherence tomography (OCT) reveals depth-resolved dynamics during functional brain activation. *Journal of Neuroscience Methods*, 178(1), 162–173. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.11.026
- Coherence (physics). (2014, July 5). In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Coherence\\_\(physics\)&oldid=611923770](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Coherence_(physics)&oldid=611923770)
- CVI Melles Griot, M. G. (n.d.). *Gradient-Index Lenses*.

- Eberle, M. M., Reynolds, C. L., Szu, J. I., Wang, Y., Hansen, A. M., Hsu, M. S., ... Park, B. H. (2012). In vivo detection of cortical optical changes associated with seizure activity with optical coherence tomography. *Biomedical Optics Express*, 3(11), 2700–2706.
- Farooq, M. U., Khasnis, A., Majid, A., & Kassab, M. Y. (2009). The role of optical coherence tomography in. *Vascular Medicine*, 14(1), 63–71. doi:10.1177/1358863X08095153
- Flusberg, B. A., Cocker, E. D., Piyawattanametha, W., Jung, J. C., Cheung, E. L. M., & Schnitzer, M. J. (2005). Fiber-optic fluorescence imaging. *Nature Methods*, 2(12), 941–950. doi:10.1038/nmeth820
- Fujimoto, J. G. (2009). *Biomedical Optical Imaging*. Oxford University Press.
- Fujimoto, J. G., Pitris, C., Boppart, S. A., & Brezinski, M. E. (2000). Optical Coherence Tomography: An Emerging Technology for Biomedical Imaging and Optical Biopsy. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 2(1-2), 9–25.
- Gaussian beam. (2014, July 5). In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Gaussian\\_beam&oldid=615244212](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Gaussian_beam&oldid=615244212)
- Ghosh, K. K., Burns, L. D., Cocker, E. D., Nimmerjahn, A., Ziv, Y., El Gamal, A., & Schnitzer, M. J. (2011). Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nature Methods*, 8(10), 871–878.
- Girouard, H., & Iadecola, C. (2006). Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *Journal of Applied Physiology*, 100(1), 328–335. doi:10.1152/japplphysiol.00966.2005
- Gomez-Reino, C., Perez, M. V., & Bao, C. (2002). *Gradient-Index Optics: Fundamentals and Applications*. Springer Science & Business Media.

- Gradient-index optics. (2014, July 5). In *Wikipedia, the free encyclopedia*. Retrieved from [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Gradient-index\\_optics&oldid=573693727](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Gradient-index_optics&oldid=573693727)
- Greer, P. L., & Greenberg, M. E. (2008). From Synapse to Nucleus: Calcium-Dependent Gene Transcription in the Control of Synapse Development and Function. *Neuron*, 59(6), 846–860. doi:10.1016/j.neuron.2008.09.002
- Gu, M. (1996). *Principles of Three Dimensional Imaging in Confocal Microscopes*. World Scientific.
- Hajihashemi, M. R., Zhang, T., Ormerod, B. K., & Jiang, H. (2014). Non-invasive detection of optical changes elicited by seizure activity using time-series analysis of light scattering images in a rat model of generalized seizure. *Journal of Neuroscience Methods*, 227, 18–28. doi:10.1016/j.jneumeth.2014.02.002
- Jung, W., Benalcazar, W., Sharma, U., Boppart, S. A., Tu, H., & Ahmad, A. (2010). Numerical analysis of gradient index lens-based optical coherence tomography imaging probes. *Journal of Biomedical Optics*, 15(6), 066027–066027.
- Kim, J. K., Choi, J. W., & Yun, S. H. (2013). 350 um side-view optical probe for imaging the murine brain in vivo from the cortex to the hypothalamus. *Journal of Biomedical Optics*, 18(5), 050502. doi:10.1117/1.JBO.18.5.050502
- Kim, J. K., Lee, W. M., Kim, P., Choi, M., Jung, K., Kim, S., & Yun, S. H. (2012). Fabrication and operation of GRIN probes for in vivo fluorescence cellular imaging of internal organs in small animals. *Nature Protocols*, 7(8), 1456–1469.

- Kim, P., Puoris'haag, M., Côté, D., Lin, C. P., & Yun, S. H. (2008). In vivo confocal and multiphoton microendoscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 13(1), 010501–010501–3. doi:10.1117/1.2839043
- König, K., Weinigel, M., Hoppert, D., Bückle, R., Schubert, H., Köhler, M. J., ... Elsner, P. (2008). Multiphoton tissue imaging using high-NA microendoscopes and flexible scan heads for clinical studies and small animal research. *Journal of Biophotonics*, 1(6), 506–513. doi:10.1002/jbio.200810049
- La Fougère, C., Rominger, A., Förster, S., Geisler, J., & Bartenstein, P. (2009). PET and SPECT in epilepsy: A critical review. *Epilepsy & Behavior*, 15(1), 50–55. doi:10.1016/j.yebeh.2009.02.025
- Lee, W. M., & Yun, S. H. (2011). Adaptive aberration correction of GRIN lenses for confocal endomicroscopy. *Optics Letters*, 36(23), 4608–4610. doi:10.1364/OL.36.004608
- Leithner, C., & Royle, G. (2013). The oxygen paradox of neurovascular coupling. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 34(1), 19–29.
- Lemire-Renaud, S., Strupler, M., Benboujja, F., Godbout, N., & Boudoux, C. (2011). Double-clad fiber with a tapered end for confocal endomicroscopy. *Biomedical Optics Express*, 2(11), 2961–2972. doi:10.1364/BOE.2.002961
- Levene, M. J., Dombeck, D. A., Kasischke, K. A., Molloy, R. P., & Webb, W. W. (2004). In vivo multiphoton microscopy of deep brain tissue. *Journal of Neurophysiology*, 91(4), 1908–1912.

- Liang, C.-P., Wierwille, J., Moreira, T., Schwartzbauer, G., Jafri, M. S., Tang, C.-M., & Chen, Y. (2011). A forward-imaging needle-type OCT probe for image guided stereotactic procedures. *Optics Express*, *19*(27), 26283–26294.
- Logothetis, N. K. (2008). What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature*, *453*(7197), 869–878. doi:10.1038/nature06976
- Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, *20*(5), 359–368. doi:10.1016/j.seizure.2011.01.003
- Macé, E., Montaldo, G., Cohen, I., Baulac, M., Fink, M., & Tanter, M. (2011). Functional ultrasound imaging of the brain. *Nature Methods*, *8*(8), 662–664. doi:10.1038/nmeth.1641
- Madore, J. W., De Montigny, E., Ouellette, O., Duchesne de Lamotte, É., Strupler, M., Goulamhousen, N., ... Boudoux, C. (2013). Novel double clad fiber coupler for endoscopy. In I., Reitze, D., Alic, N., and Hagan, D. Kang (Ed.), *Frontiers in Optics 2013* (p. FW5B.3). Optical Society of America. doi:10.1364/FIO.2013.FW5B.3
- Makhlouf, H., Rouse, A. R., & Gmitro, A. F. (2011). Dual modality fluorescence confocal and spectral-domain optical coherence tomography microendoscope. *Biomedical Optics Express*, *2*(3), 634–644.
- Niederer et al. (2001). Image quality of endoscopes. *Proc.SPIE*, *4158*.
- Patolsky, F., Timko, B. P., Yu, G., Fang, Y., Greytak, A. B., Zheng, G., & Lieber, C. M. (2006). Detection, Stimulation, and Inhibition of Neuronal Signals with High-Density Nanowire Transistor Arrays. *Science*, *313*(5790), 1100–1104. doi:10.1126/science.1128640

- Peña, F., & Tapia, R. (2000). Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience*, *101*(3), 547–561.
- Pichler, B. J., Wehrl, H. F., & Judenhofer, M. S. (2008). Latest Advances in Molecular Imaging Instrumentation. *Journal of Nuclear Medicine*, *49*(Suppl\_2), 5S–23S. doi:10.2967/jnumed.108.045880
- Pillai, R. S., Lorensen, D., & Sampson, D. D. (2011). Deep-tissue access with confocal fluorescence microendoscopy through hypodermic needles. *Optics Express*, *19*(8), 7213–7221.
- Pitkänen, A., Schwartzkroin, P. A., & Moshé, S. L. (2005). *Models of Seizures and Epilepsy*. Academic Press.
- Podoleanu, A. G., & Jackson, D. A. (1998). Combined optical coherence tomograph and scanning laser ophthalmoscope. *Electronics Letters*, *34*(11), 1088–1090. doi:10.1049/el:19980793
- Podoleanu, A. G., & Jackson, D. A. (1999). Simultaneous optical coherence tomography and confocal imaging for retinal investigations (Vol. 3732, pp. 362–366). doi:10.1117/12.340036
- Prasher, V. P., & Kerr, M. P. (Eds.). (2008). *Epilepsy and Intellectual Disabilities*. London: Springer London. Retrieved from <http://link.springer.com/10.1007/978-1-84800-259-3>
- Risi, M. D. (2014). *Advances in combined endoscopic fluorescence confocal microscopy and optical coherence tomography*. THE UNIVERSITY OF ARIZONA. Retrieved from <http://gradworks.umi.com/36/34/3634263.html>

- Rossignol, E. (2011). Genetics and function of neocortical GABAergic interneurons in neurodevelopmental disorders. *Neural Plasticity*, 2011. Retrieved from <http://www.hindawi.com/journals/np/aip/649325/>
- Shorvon, S. (2009). *Epilepsy*. Oxford University Press.
- Srinivasan, V. J., Sakadžić, S., Gorczynska, I., Ruvinskaya, S., Wu, W., Fujimoto, J. G., & Boas, D. A. (2009). Depth-resolved microscopy of cortical hemodynamics with optical coherence tomography. *Optics Letters*, 34(20), 3086–3088.
- Tadmouri, A., Kiyonaka, S., Barbado, M., Rousset, M., Fablet, K., Sawamura, S., ... De Waard, M. (2012). Cacnb4 directly couples electrical activity to gene expression, a process defective in juvenile epilepsy. *The EMBO Journal*, 31(18), 3730–3744. doi:10.1038/emboj.2012.226
- Tsytsarev, V., Rao, B., Maslov, K. I., Li, L., & Wang, L. V. (2013). Photoacoustic and optical coherence tomography of epilepsy with high temporal and spatial resolution and dual optical contrasts. *Journal of Neuroscience Methods*, 216(2), 142–145.
- Valentín, A., & Alarcón, G. (2012). *Introduction to Epilepsy*. Cambridge University Press.
- Vincent, P., Maskos, U., Charvet, I., Bourgeais, L., Stoppini, L., Leresche, N., ... Paupardin-Tritsch, D. (2006). Live imaging of neural structure and function by fibred fluorescence microscopy. *EMBO Reports*, 7(11), 1154–1161.
- Wang, L. V., & Wu, H. (2012). *Biomedical Optics: Principles and Imaging*. John Wiley & Sons.
- Yaseen, M. A., Srinivasan, V. J., Sakadžić, S., Radhakrishnan, H., Gorczynska, I., Wu, W., ... Boas, D. A. (2011). Microvascular oxygen tension and flow measurements in rodent cerebral cortex during baseline conditions and functional activation. *Journal of Cerebral*



*Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(4), 1051–1063. doi:10.1038/jcbfm.2010.227

Yu, Y.-C., Bultje, R. S., Wang, X., & Shi, S.-H. (2009). Specific synapses develop preferentially among sister excitatory neurons in the neocortex. *Nature*, 458(7237), 501–504. doi:10.1038/nature07722

Yuan, S., Roney, C. A., Wierwille, J., Chen, C.-W., Xu, B., Jiang, J., ... Chen, Y. (2010). Combining Optical Coherence Tomography with Fluorescence Molecular Imaging: Towards Simultaneous Morphology and Molecular Imaging. *Physics in Medicine and Biology*, 55(1), 191–206. doi:10.1088/0031-9155/55/1/011

## ANNEXE 1 – PIÈCES DU MONTAGE

Manufacturier	Qté	Numéro #	Description
National Instruments	1	NI USB-6351	USB Multifunction DAQ (data acquisition)
MICROSCOPE CONFOCAL			
UltraLasers	1	DHOM-L-473-50	473 nm DPSS Laser (Diode-pumped solid state), 50mW
Thorlabs	4	RS3P4M	Ø25 mm Pedestal Pillar Post, M4 Taps, 75 mm Long, Metric
Thorlabs	1	C4W	30 mm Cage System Cube, 4-Way
Thorlabs	1	FFM1/M	Cage-Compatible Dichroic Filter Mount
Thorlabs	1	B1C/M	Blank Cover Plate with Rubber O-Ring for C4W/C6W, Metric
Thorlabs	1	B4C/M	Rotatable Kinematic Cage Cube Platform for C4W/C6W, Metric
Thorlabs	2	SM1CP1	End Cap Internal Threads, SM1 Series
Hamamatsu	1	R3896	Photomultiplier Tube (PMT)
Semrock	1	FITC-3540C-000	BrightLine® single-band filter set, optimized for FITC and other like fluorophores
Thorlabs	1	460HP	Single Mode Optical Fiber, 450 – 600 nm , Ø125 µm Cladding ** demander coating?
Thorlabs	2	F260SMA-A	543 nm, f = 15.01 mm, NA = 0.17 SMA Fiber Collimation Pkg. (* Demander 478 nm)
Thorlabs	4	AD11F	SM1 Adapter for Ø11 mm Collimators
Thorlabs	2	KCB1	Right Angle Kinematic Mirror Mount, 30 mm Cage System, SM1
Thorlabs	1	ME1-P01	Ø1" Protected Silver Mirror, 3.2 mm Thick
Thorlabs	1	BSF10-A	Ø1" UVFS Beam Sampler for Beam Pick-Off, ARC: 350-700 nm, t=5 mm
Thorlabs	1	SM05PD1B (anode grounded)	Large Area Mounted Silicon Photodiode, 350-1100 nm, Anode
Thorlabs	1	SFS50/125Y	Multimode Fiber, 0.22 NA, High-OH, Ø50 µm Core, UV-NIR
Thorlabs	2	F260APC-A	543 nm, f = 15.01 mm, NA = 0.17 FC/APC Fiber Collimation Pkg (Demander custom 520 nm?)
Thorlabs	1	KM100V/M	Small Kinematic V-Clamp Mount, Metric
Thorlabs	5	PH2/M	Post Holder with Spring-Loaded Hex Locking Thumbscrew, L = 50.8 mm
Thorlabs	2	PH2E/M	Pedestal Post Holder, Spring-Loaded Hex Locking Thumbscrew, L = 55.5 mm

Thorlabs	7	TR75/M	Ø12.7 mm x 75 mm Stainless Steel Optical Post, M4 Stud, M6 Tapped Hole
Thorlabs	2	CF175	Large Clamping Fork, 1.75" Counterbored Slot, Universal
Thorlabs	2	CF125	Small Clamping Fork, 1.25" Counterbored Slot, Universal
Thorlabs	4	ER2	Cage Assembly Rod, 2" Long
Thorlabs	4	ER2	Cage Assembly Rod, 2" Long
Thorlabs	4	ER4	Cage Assembly Rod, 4" Long
Thorlabs	4	ER6	Cage Assembly Rod, 6" Long
Thorlabs	4	ERSCA	ER Rod Adapter for Ø6 mm ER Rods
Thorlabs	1	SM05M10	SM05 Lens Tube, 1" Long, Two Retaining Rings Included
Thorlabs	1	SM05M20	SM05 Lens Tube, 2" Long, Two Retaining Rings Included
Thorlabs	2	SM1L30C	SM1 3" Slotted Lens Tube
Thorlabs	1	MB3045/M	Aluminum Breadboard, 300 mm x 450 mm x 12.7 mm, M6 Threaded
<b>BRAS D'IMAGERIE ET ENDOSCOPE</b>			
	1	Windows Computer	Computer with screen
Thorlabs	2	GVSM002	2D Galvo System with metric accessories
Thorlabs	1	GCM002/M	2D Galvo Cage Mount Metric
Edmund Optics	1	49-323	12.5mm Dia. X 25mm FL VIS-NIR Coating, Achromatic Lens
Edmund Optics	1	49-329	12.5mm Dia. X 60mm FL, VIS-NIR Coating, Achromatic Lens
Thorlabs	3	LMR05/M	Metric, Lens Mount for Ø1/2" Optics, One Retaining Ring Included
Thorlabs	1	RMS20X	20X Olympus Plan Achromat Objective, 0.4 NA, 1.2 mm WD
Thorlabs	2	SM1A1	Adapter with External SM05 Threads and Internal SM1 Threads
Thorlabs	2	SM05RMS	Adapter with External RMS Threads and Internal SM05 Threads
Thorlabs	2	SM1A6	Adapter with External SM1 Threads and Internal SM05 Threads, 0.15" Thick
<b>OCT</b>			
National Instruments	1	NI PCIe-6353	Acquisition card and accessories
TBD	1	Windows Computer	Computer with screen and nvidia graphic card
Thorlabs	1	LTC100-A	LD and TEC Driver kit
Thorlabs	1	L488P060MLD	488 nm Laser diode, 60mW

Thorlabs	1	MB60120/M	Breadboard, 600 x 1200 mm
Thorlabs	1	PFM52502	Lightweight workstation for 600x1200 breadboard
Semrock	2	Filter kits	Filters for fluorescence
Thorlabs	2	DFM/M	Filter cubes
Thorlabs	1	2000018090	12V Power Supply
Thorlabs	1	AC080-010-B	DIA = 8.0mm, f = 10.0mm, Near IR Achromat, 650-1050nm
Thorlabs	1	AP90/M	Precision Right Angle Plate
Thorlabs	1	B3C/M	Rotatable Cage Cube Platform for C4W/C6W, Metric
Thorlabs	3	BE1/M	Pedestal Base Adapter – Metric
Thorlabs	5	CF125	Small Clamping Fork, 1.25 » Counterbored Slot, Universal
Thorlabs	2	CP02/M	SM1 Threaded 30 mm Cage Plate, 0.35 » Thick, Metric
Thorlabs	4	ER6	Cage Assembly Rod, 6 » Long, Ø6 mm
Thorlabs	1	FFM1	Cage-Compatible Dichroic Filter Mount
Thorlabs	1	HPT1	30 mm Cage Assembly, XY Translating Lens Mount
Thorlabs	1	LMRA8	8 mm Small Optic Adapter
National instruments	1	PCIe-1429	Camera Link acquisition card
Thorlabs	2	PH2/M	Post Holder with Spring-Loaded Thumbscrew, L=50.8 mm
Thorlabs	3	PH3/M	Post Holder with Spring-Loaded Thumbscrew, L=76.2 mm
Thorlabs	2	PT1/M	25 mm Translation Stage
Thorlabs	2	RS4P/M	Ø1 » Pedestal Pillar Post , Length=100mm
CourierTronics	1	S4LFT2163/094	160 mm f-Theta lens for spectrometer
Thorlabs	1	SM05L03	SM05 Lens Tube, 0.3 » Long
Thorlabs	1	SM1A10	Adapter with External SM1 Threads and Internal C-Mount Threads

Thorlabs	1	SM1A6	Adapter with External SM1 Threads and Internal SM05
Thorlabs	1	SM1FCA	SM1-Threaded (1.035 »-40) FC/APC Fiber Connector Adapter Plate
Basler	1	spL2048 -140k	Sprint
Thorlabs	2	TR40/M	Ø1/2 » x 40 mm Post, Metric
Thorlabs	1	TR75/M	Ø1/2 » x 75 mm Post, Metric
Thorlabs	2	TR75/M	Ø1/2 » x 75 mm Post, Metric
Wasatch Photonics	1	VPHG	1200 lpmm
Thorlabs	1	AP90RL/M	Large Angle Bracket – Metric
Thorlabs	4	BE1/M	Pedestal Base Adapter – Metric
Fiber Control Industries	3	FPC-14	Fiber Polarization Controller
National instruments	1	NI USB-6221	M Series Multifunction DAQ for USB
AC Photonics	2	WP87500202B2211-1.5M	Wideband 870, 2x2 coupler
Thorlabs	2	CP02/M	SM1 Threaded 30 mm Cage Plate, 0.35 » Thick, Metric
Thorlabs	2	ER4	Cage Assembly Rod, 4 » Long, Ø6 mm
Thorlabs	1	KM100-E03	Kinematic Mirror Mount with Near IR Laser Quality Mirror
Thorlabs	1	LCPM/M	Metric Horizontal Cage Assembly Platform
NewPort	2	M-BC-5	Adjustable-Height Base Clamp, Short, M6 Tapped Holes, Metric
Thorlabs	1	PH1.5/M	Post Holder with Spring-Loaded Thumbscrew, L=38.1 mm
Thorlabs	2	PH2/M	Post Holder with Spring-Loaded Thumbscrew, L=50.8 mm
Thorlabs	1	PM1/M	Small Clamping Arm, Metric
Thorlabs	2	PS908L-B	BK7 Right Angle Prism, 20 mm , AR Coating on Legs : 650-1050 nm
Thorlabs	1	PT1/M	Metric Translation Stage
Thorlabs	1	PT101	Base Plate For PT Series

Thorlabs	1	TR40/M	Ø1/2 » x 40 mm Post, Metric
Thorlabs	2	TR50/M	Ø1/2 » x 50 mm Post, Metric
Thorlabs	1	BB1-E03	Ø1 » Broadband Dielectric Mirror, 750-1100 nm
Thorlabs	1	C1526/M	30 mm Cage Clamp for Ø1.5 » P-Posts, Metric
Thorlabs	2	CP02/M	SM1 Threaded 30 mm Cage Plate, 0.35 » Thick, Metric
Thorlabs	4	ER2	Cage Assembly Rod, 2 » Long
Thorlabs	4	ER2	Cage Assembly Rod, 2 » Long
Thorlabs	4	ER4	Cage Assembly Rod, 4 » Long
Thorlabs	4	ER6	Cage Assembly Rod, 6 » Long
Thorlabs	4	ERSCA	ER Rod Adapter for Ø6 mm ER Rods
Thorlabs	1	GPS011	Linear Galvo Power Supply
Thorlabs	1	GVS002	2D Galvo System : Two Mirrors (Orthogonal) and Two Servo Control Boards
Thorlabs	1	HPT1	30 mm Cage Assembly, XY Translating Lens Mount
Thorlabs	1	KCB1	Right Angle Kinematic Mirror Mount, 30 mm Cage System, SM1
Thorlabs	1	LB1437-B	BK7 B Coated Bi-Convex Lens, DIA = 25.4 mm, f = 150.0 mm
Thorlabs	1	LB1471-B	BK7 B Coated Bi-Convex Lens, DIA = 25.4 mm, f = 50.0 mm
Thorlabs	1	LF1547-B	f = -150.0 mm, Ø1 » BK7, - Meniscus Lens, AR Coating : 650-1050 nm
NewPort	1	MV-20X	Valumax Objective Lens, 20x, 0.40 NA, 8.5mm Focal Length, 7.5mm Clear Aperture
Thorlabs	1	OT1	Objective Lens Turret, 4 RMS Threaded Objective Ports
Thorlabs	1	P250/M	Mounting Post, Length=250 mm
Thorlabs	1	PB4/M	P-Series Pedestal Base Adapter – Metric
Thorlabs	1	PF175	P-Series Clamping Fork

Thorlabs	1	SM1L10	SM1 Lens Tube, 1 » Long, One Retaining Ring Included
Thorlabs	1	ADAFC3	FC/APC to FC/APC Mating Sleeve
Exalos	1	EBD4000-0000	SLD Driver Board
Exalos	1	EXS8710-2411	870nm SLD, 14-pin Butterfly, Package, MPD, FC/APC
Thorlabs	1	PT1/M	25 mm Translation Stage
Thorlabs	1	STK01	Cage Assembly Optic Swapper Plate
Thorlabs	1	VRC2SM1	SM1-Threaded IR and Visible Alignment Disk
Thorlabs	1	NDC-50C-4M	Mounted Continuously Variable ND Filter, Ø50 mm, D : 0-4.0
Thorlabs	2	PH2/M	Post Holder with Spring-Loaded Thumbscrew, L=50.8 mm
Thorlabs	1	PT101	Base Plate For PT Series
Thorlabs	2	TR50/M	Ø1/2 » x 50 mm Post, Metric
Thorlabs	4	AC080-016-B	DIA = 8.0mm, f = 16.0mm, Near IR Achromat, 650-1050nm
Thorlabs	1	GCM002/M	2D Galvo Cage Mount Metric
Cargille	1	11510	Cargille BK 7 Matching Liquid
Thorlabs	1	C6W	30 mm Cage System Cube with Ø6 mm Clearance Holes
Thorlabs	1	FM03	45° Cold Mirror, Dia = 1 », AOI = 45°, 1 mm Thick
Thorlabs	1	B5C	Ø1 » Cage Cube Optic Mount For B3C
Thorlabs	1	B3C/M	Rotatable Cage Cube Platform for C4W/C6W, Metric
Thorlabs	1	DCC1645C	High Resolution USB2.0 CMOS Camera, 1280 x 1024, Color
Thorlabs	4	ER3	Cage Assembly Rod, 3 » Long, Ø6 mm, Qty. 1
Thorlabs	2	CP02/M	SM1 Threaded 30 mm Cage Plate, 0.35 » Thick, Metric
Thorlabs	1	LA1131-A	N-BK7 Plano-Convex Lens, Ø1 », f = 50.0 mm, ARC : 350-700 nm
Thorlabs	1	LA1951-A	N-BK7 Plano-Convex Lens, Ø1 », f = 25.4 mm, ARC : 350-700 nm

Thorlabs	1	SM1L03	SM1 Lens Tube, L = 0.3 », One Retaining Ring Included
Thorlabs	1	SM1T2	SM1 (Ø1.035 »-40) Coupler, External Threads, 0.5 » Long
Bockoptronics	1	25-020052	Makro system to C-Mount adapter
Bockoptronics	1	25-020178	10mm makro system extension Tube
Bockoptronics	1	21-1014593	TELE-XENAR 2.2/70MM COMPACT
CourierTronics	1	S4LFT0202/094	200 mm f-Theta lens for spectrometer
Thorlabs	1	AD11F	SM1 Adapter for Ø11 mm Collimators
Edmund Optics	1	NT47-225	0.16 NA Fiber Collimator w/ FC Connector, 780nm Alignment
Micropoly	1		Computer
Edmund Optics	1	NT53-212	Circular ND Filter 60mm Dia 0.04-1.5 Optical Density
Newport	1	PRC-3	PRL Carrier, 1/4-20 holes, 3.5 in. (88.9 mm)
Newport	1	PRL-12	PRL Rail, 12 in
Thorlabs	1	KM100T	Kinematic Mount For Thin Ø1 » Optics
Thorlabs	1	MB2025/M	Aluminum Breadboard, 200 mm x 250 mm x 12.7 mm, M6 Threaded



## ANNEXE 2 – SPÉCIFICATIONS DE L'ENDOSCOPE GRIN

### Preliminary Specifications

To:

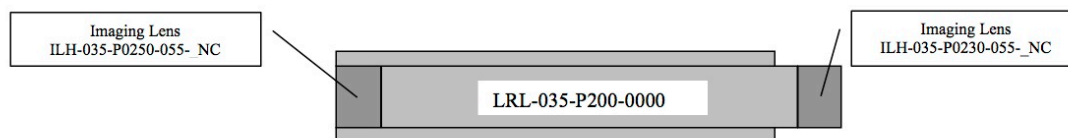
**NSG Part Number:** LRL-035-P200-2002-EPM03

**Part Description:** SELFOC Rod with 2 lenses

**Diagram:** Included.

**R&D confirmation:** Received.

### Product Illustration:



SS tube : Lens total length -7/-7.5mm

### SRL Specifications:

Diameter (mm)	PITCH	SRL Length(mm)	ILH Length(mm)	Total Length(mm)	SRL NA	View Angle
0.35	2	29.8 ± 1.0	Refer below	31.2 ± 1.2	0.119	13.5°

### Imaging Lens Specifications:

Lens type & Dia. (mm)	Lens Length (mm)	Typical $\sqrt{A}$ (mm <sup>-1</sup> )	View Angle	Index of Refraction
ILH-035-P0250	0.72 ± 0.10	2.196	70° min.	1.666
ILH-035-P0230	0.66 ± 0.10	2.196	70° min.	1.666

### Product Notes:

NSG will make use of a one pitch SELFOC Rod Lens (SRL) LRL-035-P200-0000 and will assemble/attach two custom imaging lenses (ILH-035-P0250/P0230-055-NC) on each side. The stainless steel tube will be assembled, with 7 mm protrusion at 0.23 pitch lens side. For more detailed specs about the SRL or ILH lenses please refer to pages 14 & 15 of NSG's Catalog.

Harry Imai, Production Manager

Wednesday, August 26, 2013